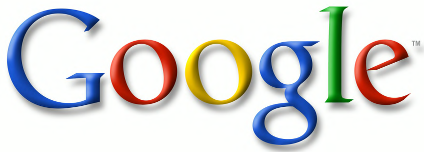
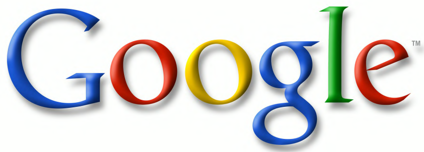






ANNALI
D'IGIENE SPERIMENTALE

PUBBLICATI DAI PROFESSORI

G. BORDONI - UFFREDUZZI (Milano) — P. CANALIS (Genova) — O. CASAGRANDI (Cagliari) — A. CELLI (Roma) — C. FERMI (Sassari) — V. DE GIAXA (Napoli) — E. DI MATTEI (Catania) — A. DI VESTEA (Pisa) — A. MAGGIORA (Modena) — L. MANFREDI (Palermo) — G. ROSTER (Firenze) — G. SANARELLI (Bologna) — F. SANFELICE (Messina) — A. SERAFINI (Padova) — G SORMANI (Pavia) — G. ZIINO (Messina)

E DIRETTI DAL

PROF. ANGELO CELLI

(Continuazione degli *Annali dell' Istituto d' Igiene sperimentale dell' Università di Roma*)

VOLUME XVII (NUOVA SERIE)
(CON XVII TAVOLE CROMO-LITOGRAFICHE)



UNIONE TIPOGRAFICO-EDITRICE TORINESE
MILANO — TORINO — ROMA — NAPOLI

1907

INDICE DEL VOLUME XVII

Istituto d'Igiene della R. Università di Messina

Sull'azione dei prodotti solubili dei blastomiceti in rapporto alla etiologia dei tumori maligni.

Ricerche del prof. **FRANCESCO SANFELICE.**

(Con le Tavole I-X).

I.

La obbiezione più autorevole messa innanzi da alcuni osservatori contro la importanza dei blastomiceti patogeni nella genesi dei tumori maligni si fonda sul fatto che con la inoculazione delle colture pure nei cani si erano ottenuti risultati positivi troppo scarsi, in modo che si poteva affermare che i tumori sviluppati non erano stati prodotti dai parassiti inoculati, ma si erano sviluppati per pura coincidenza, indipendentemente da questi. A parte il fatto che la percentuale da me ottenuta nei cani del 10,3 era di molto superiore a quella notata dal Casper del 4,7 e dallo Johne del 5,8 e che perciò la obbiezione aveva poco fondamento, uno degli intenti che più specialmente mi premeva di raggiungere era quello di ottenere, in seguito alle inoculazioni, una percentuale abbastanza elevata di risultati positivi, in guisa da demolire la facile e superficiale obbiezione.

Per lo passato io aveva praticato le inoculazioni stemperando in acqua sterile un po' di patina colturale, trascurando i prodotti solubili elaborati *in vitro,* perchè a questi da principio non dava alcuna importanza nell'azione patogena che i blastomiceti possono esercitare nell'organismo animale, specialmente dopo essermi convinto per una serie di ricerche che pubblicai nel 1896 (1) che i prodotti

(1) *Ueber die Immunität gegen Blastomyceten.* Centralblatt f. Bakteriologie, 1896.

solubili elaborati dal *Saccharomyces neoformans* in un liquido costituito da 100 parti di acqua, 1 parte di glucosio ed 1 parte di peptone, inoculati anche in considerevole quantità nel connettivo sottocutaneo delle cavie, non solo non producevano alcuna alterazione, ma non preservavano neanche le cavie dalla morte, se loro s'inoculava una piccola quantità della coltura virulenta del *Saccharomyces neoformans*. La composizione del liquido forse non si prestava alla elaborazione di prodotti solubili capaci di esercitare azione nell'organismo.

Or sono tre anni, praticando una serie d'inoculazioni endotracheali nelle cavie e nei conigli, mi avvidi che quando s'inoculavano i soli parassiti, questi si moltiplicavano considerevolmente ed il tessuto dava scarsa reazione, mentre quando s'inoculavano i parassiti insieme coi loro prodotti solubili, elaborati su substrati di nutrizione solidi, si otteneva una limitatissima moltiplicazione dei blastomiceti ed una considerevole proliferazione da parte degli elementi cellulari. Si aggiunga inoltre che nei conigli, con la inoculazione endotracheale dei soli parassiti, non aveva ottenuto alcun risultato positivo e con la inoculazione dei parassiti insieme coi loro prodotti solubili costantemente i conigli erano morti, presentando alla autopsia lesioni molto importanti nei polmoni.

Da questa prima serie di esperimenti pubblicata recentemente (1) risultava chiara la importanza dell'azione dei prodotti solubili nella genesi delle lesioni polmonali.

Incoraggiato da questi risultati intrapresi subito lo studio dell'*azione che i parassiti con i prodotti solubili ed i prodotti solubili soli sono capaci di esercitare nei cani e nei gatti*, facendo anche una numerosa serie di esperimenti nei conigli e pure nelle cavie, non sembrandomi punto giusta la osservazione dell'Hansèmann che questi animali non sono adatti per queste ricerche, perchè in essi finora nessuno ha veduto svilupparsi spontaneamente un cancro. Nelle cavie finora nessuno ha veduto svilupparsi spontaneamente il carbonchio e pure sono tra gli animali più suscettibili alla infezione carbonchiosa.

Ad accrescere il materiale d'inoculazione, *alla collezione dei blastomiceti patogeni, che già possedevo, se ne aggiunse un altro, che isolai da un tumore di un grosso cane danese.* Al principio dello scorso anno mi fu portato questo cane, il quale presentava un grosso tumore al pene in forma di escrescenze a cavolofiore. La parte maggiore del tumore s'impiantava sulla mucosa prepuziale parietale e la parte più

---

(1) *Ueber die pathogene Wirkung der in Trachea geimpften Blastomyceten.* Centralblatt f. Bakteriologie, 1906.

piccola sotto forma nodulare aveva impianto direttamente sul pene. Si trattava di un sarcoma simile perfettamente a quelli che io aveva osservato sperimentalmente in altri cani e che avevo descritto nei lavori precedenti. Alcuni pezzi del tumore, della grandezza di nocciuole, furono, appena ucciso l'animale, inoculati nel connettivo sottocutaneo del dorso di un cane, di un gatto e di un coniglio, previa incisione della cute e consecutiva sutura. Il cane morì dopo 1 mese ed al sito d'inoculazione si trovò riassorbito il pezzo di tumore inoculato. Il gatto morì dopo 1 mese e mezzo e neanche presentava nulla al sito d'inoculazione e negli organi. Il coniglio morì dopo 5 giorni ed al sito d'inoculazione si trovò il pezzo di tumore inoculato compreso in mezzo a considevole quantità di pus. Non si riscontrarono lesioni negli organi. Allo esame microscopico del pus si videro parecchi blastomiceti. Si fecero allora strisciamenti col pus su vasta superficie di patate sterili e si fecero piastre in agar con aggiunta di mosto. Tanto sulle patate, quanto sulle piastre di agar, in mezzo alle numerosissime colonie di altri microrganismi si potettero isolare, con non poca difficoltà, le colonie del blastomicete, il quale appariva morfologicamente e culturalmente perfettamente simile agli altri blastomiceti patogeni, che posseggo in collezione. Siccome il tumore del cane non era ulcerato e siccome con la inoculazione del blastomicete isolato si riprodusse in un cane, con la inoculazione nel connettivo sottocutaneo in vicinanza del pene, un tumore di struttura perfettamente simile a quello, da cui fu isolato, si deve ritenere che la sua presenza non fosse accidentale.

Questo blastomicetè l'ho distinto col nome di *Saccharomyces canis II.* Quando i blastomiceti si coltivano su patate in tubi chiusi con tamponi di ovatta, vivono a lungo, perchè il substrato di nutrizione perde l'acqua, prima che i parassiti abbiano consumato tutto il materiale di nutrizione. Una volta essiccato il materiale di nutrizione, i blastomiceti resistono anni ed anni, conservando intatto il potere patogeno. Se invece, dopo avere innestato il substrato di nutrizione. si chiudono i tubi alla fiamma e si pongono nella stufa a 37° C, già dopo 20-30 giorni sono morti. Tenendo le colture in tubi chiusi, non nella stufa, ma alla temperatura ambiente, occorrono parecchi mesi prima che avvenga la loro morte.

Le colture su patate in tubi chiusi, una volta morti i blastomiceti, possono servire da un lato per lo studio delle patine colturali, dall'altro per quello dei prodotti solubili.

Quanto alle patine colturali riesce facile raschiarle dalla superficie del substrato di nutrizione ed inocularle negli animali sospese

in acqua sterile. Quanto ai prodotti solubili si possono triturare i substrati di nutrizione con l'apparecchio di Hoffmeister e, dopo diluizione in acqua sterile della poltiglia ottenuta, praticare inoculazioni con siringa ad ago grosso, Si è sicuri in questo modo d'inoculare solamente i prodotti solubili elaborati *in vitro* dai microrganismi, perchè questi non hanno la proprietà di penetrare nello interno del materiale di nutrizione. Volendo inoculare parassiti vivi e prodotti solubili basta sottoporre allo stesso trattamento le colture, nelle quali i parassiti non sono ancora morti.

Finora i migliori risultati li ho ottenuti coltivando i blastomiceti sulle patate sterili. Prodotti non molto attivi ho ottenuto con la coltura nel mosto a varie concentrazioni, nel brodo comune e con aggiunta di glucosio, lattosio, destrina, acido tartarico, *fucus crispus*, agar, gelatina, ecc. Sono ora in via di esperimento altre ricerche per vedere di ottenere prodotti ugualmente attivi, come quelli che si producono nelle patate, usando diverse sostanze vegetali ed animali.

Le numerose *esperienze di controllo* fatte inoculando il substrato di nutrizione nello stesso modo di quello, su cui avevano vegetato i blastomiceti patogeni, hanno dato costantemente risultato negativo.

Dei risultati ottenuti con l'inoculazione negli animali da esperimento di altri prodotti di microrganismi, come blastomiceti banali isolati dall'aria o da alcuni liquidi in fermentazione, di alcuni oidi patogeni e non patogeni, di alcune streptotricee patogene e non patogene dirò in altro lavoro.

Intorno alla natura dei prodotti solubili elaborati *in vitro* ben poco si può dire. Non si tratta probabilmente di prodotti della stessa natura degli enzimi, perchè resistono a quei gradi di temperatura, che distruggono la maggior parte degli enzimi. I metodi d'indagine chimica sono ancora troppo grossolani per poterci svelare la natura chimica di queste sostanze, e ci vorranno ancora molti anni prima di sapere se, venendo i prodotti solubili a contatto con gli elementi cellulari, agiscono per azione di contatto, per catalisi, ovvero se modificati entrano a far parte del protoplasma cellulare.

II.

Molto giustamente osserva il Ribbert (1) che le recenti ricerche d'inoculazione dei tumori da animale ad animale di altra specie o da animale ad animale della stessa specie non ci hanno insegnato

---

(1) *Beiträge zur Entstehung der Geschwülste*. Bonn., 1906.

nulla di nuovo e non hanno fatto per nulla progredire la questione della etiologia dei tumori maligni. Si tratta nient'altro che della riproduzione sperimentale di metastasi in un altro organismo della medesima specie. Interessa poco se le cellule di un tumore sono capaci di riprodursi da un animale all'altro; interessa invece molto sapere quale è stata la causa, per cui si è sviluppato il primo tumore.

Perchè la questione della etiologia dei tumori maligni faccia un passo innanzi, è necessario spiegare questa prima incognita, *svelare la ragione della moltiplicazione atipica degli elementi cellulari.*

Fin da molti anni fa si sono tentati esperimenti d'inoculazione di tumori maligni dall'uomo agli animali, qualche volta con risultato negativo, qualche altra con risultato positivo. Le prime ricerche furono pubblicate dal Langenbeck (1) nel 1840. In tutti questi esperimenti fallì del tutto la riproduzione dei tumori dall'uomo agli animali. Il Follin ed il Lebert (2) inocularono nella giugulare di un cane 60-70 gr. di emulsione in acqua sterile di un cancro della mammella e trovarono dopo 14 giorni sulle pareti del cuore noduli cancerigni e tumori grandi quanto teste di spillo nel fegato. Il Weber (3) inoculò ad un cane nella vena crurale un carcinoma del mascellare superiore senza avere risultato positivo. Il Gouyon (4) ed il Klemke (5) ottennero risultati positivi. Il Billroth (6) invece inoculò con risultati negativi carcinomi e sarcomi dell'uomo ai cani. Egli non osservò mai attecchimento, nè facendo inoculazioni sotto la cute, nè praticando inoculazioni nella giugulare. Risultati negativi ottennero il Lebert, il Wyss ed il Fischl. Il Reale (7) inoculò un pezzo di sarcoma cutaneo idiopatico emorragico sottocutaneamente ad un coniglio. Dopo 2 anni cominciò a svilupparsi un tumore, che raggiunse la grandezza di una castagna. Al microscopio il tumore presentava uno stroma connettivale con cellule ramificate ed anastomizzate. Nello stroma vi erano fibroblasti. Le cellule del tumore avevano un grosso nucleo di forma ovale, facilmente colorabile. Queste cellule erano riunite in gruppi di 2 a 3.

Nel tumore vi era pigmento in quantità scarsa. Il Reale ritenne il tumore per un sarcoma endoteliale o linfosarcoma. La deviazione dal tipo originario è spiegata dall'autore per l'influenza del nuovo terreno. Il Vischer (8) inoculò nella cavità peritoneale di un coniglio e di una cavia alcuni centimetri cubici di un'emulsione in soluzione di cloruro di sodio

(1) *Entstehung der Venenkrebse und die Möglichkeit, Carcinome von Menschen auf Thiere zu übertragen*. Schmidt's Jahrb., vol. 25.
(2) Virchow's Archiv, vol. XL.
(3) Chirurgische Erfahrungen, pag. 289.
(4) *Jahresbericht ueber die Leistungen der gesamten Medicin*, 1867.
(5) Häser's Archiv. f. die gesamten Medicin, vol. IV, 1843.
(6) Wiener med. Wochenschr., 1867.
(7) *Tentativi d'inoculazione sperimentale del sarcoma cutaneo*. Napoli, 1902
(8) Bruns' Beiträge, 1904.

che riprodurre tumori da animale ad animale, avrebbero fatto meglio a ricercare il modo di produrre con la inoculazione di germi noti il cancro in questi animali, tanto facilmente soggetti a contrarre tumori maligni, allora sì che i loro lavori avrebbero acquistata importanza.

III.

Esperimenti sui cani. — Sono stati al numero di 13. Tre cani sono stati inoculati in addome con soli prodotti; quattro sono stati inoculati anche in addome con parassiti e prodotti; tre sono stati inoculati nel connettivo sottocutaneo con soli prodotti. Di questi tre cani due sono stati inoculati nel connettivo sottocutaneo del prepuzio, il terzo nel connettivo sottocutaneo in vicinanza di una mammella. Gli altri tre cani sono stati inoculati in vena con parassiti e prodotti.

Tutti e tre i cani inoculati in addome coi soli prodotti, senza patine colturali, hanno dato risultati positivi. Qui è importante far notare che tutti gli esperimenti fatti inoculando solamente parassiti nella cavità addominale dei cani hanno dato sempre risultati negativi.

Il *primo cane inoculato in addome* con i prodotti solubili di una coltura in tubo chiuso di un blastomicete isolato parecchi anni or sono da un papilloma infettante dell'ovaio e tenuta per 4 mesi nel termostato è morto dopo un mese in preda a notevole cachessia ed ha presentato alla sezione un tumore nel grande epiploon della grandezza di un uovo di colombo; noduli di varia grandezza, disseminati nel grande omento; le glandole linfatiche mesenteriali molto ingrossate; sulla superficie superiore del fegato (fig. I, tav. III), numerose placche disseminate, rotondeggianti ed oblunghe, di forma irregolare, a margini ondulati, di colorito bianco-giallastro, alquanto sporgenti sulla superficie dell'organo. Nelle sezioni fatte perpendicolarmente alla superficie di queste placche, si vedeva che esse erano superficiali e non si approfondivano nel parenchima dell'organo. Le più piccole erano strettamente aderenti al centro alla capsula del fegato. Sulla faccia inferiore del centro tendineo del diaframma si riscontravano le stesse placche, ma meno numerose. La sierosa della cavità peritoneale non presentava traccia d'infiammazione ed era liscia e lucente. Non vi era alcuna aderenza fra gli organi della cavità addominale. Nulla si osservava macroscopicamente nei reni e nella milza. Alla sezione dei polmoni si vedevano chiazze di colorito giallastro, disseminate, numerose specialmente nei lobi inferiori.

Le colture in agar, gelatina e su patate fatte dalla milza, dal fegato, dai noduli dell'omento diedero risultato negativo.

Il tumore principale del grande omento istologicamente è costituito da cellule con corpo protoplasmatico ampio, con nucleo vescicolare, facilmente colorabile. In alcune cellule il nucleo è situato al centro del corpo protoplasmatico, in altre si presenta un poco spostato verso la periferia. I corpi protoplasmatici delle cellule sono giustaposti, senza apparente sostanza

intercellulare. Gruppi più o meno estesi di queste cellule sono separati da connettivo poco abbondante, qua e là leggermente infiltrato.

In mezzo ai gruppi di cellule innanzi descritte si vedono delle formazioni cistiche, costituite dalle stesse cellule, con disposizione radiale intorno ad un centro occupato o da una sostanza amorfa o da un piccolo accumulo di sostanza jalina, nella quale si trova più o meno abbondante *detritus* nucleare. Nelle sezioni in serie di queste formazioni cistiche muta l'aspetto delle cellule, a seconda che il taglio capita verso la periferia ovvero verso la parte centrale. Mentre nelle sezioni che rasentano la periferia, le cellule nella loro disposizione sono perfettamente identiche a quelle che costituiscono la massa principale del tumore, nelle sezioni che interessano la parte centrale della formazione, le cellule assumono l'aspetto cilindrico e sono disposte a più strati, strettamente ravvicinate le une alle altre, a raggi intorno al centro della formazione.

Alcune di queste neoformazioni cistiche sono separate dal tessuto che forma la parte principale del tumore da uno o più strati di cellule fusate, altre si presentano separate dal restante tessuto del tumore da più strati di cellule che hanno lo stesso aspetto delle cellule del tumore, ma sono appiattite. Sono diversi aspetti che assumono le parti periferiche di queste neoformazioni, a seconda che sono di età più o meno avanzata. Si tratta della trasformazione delle cellule del tumore, che limitano queste formazioni cistiche in cellule connettivali fusate, che tendono ad isolarle (fig. 4, tav. V).

I noduli disseminati sul grande omento hanno la stessa struttura del tumore principale. La struttura delle placche esistenti sulla superficie del fegato (fig. 1, tav. III) è la stessa di quella del tumore innanzi descritto, con la sola differenza che le formazioni cistiche sono assai più numerose (figure 2-3, tav. III). Nelle sezioni in serie di queste placche si osserva che esse non aderiscono alla capsula del fegato in tutta la loro estensione, ma solamente per una porzione limitata della superficie inferiore. L'aderenza è fatta da un tessuto connettivo, in mezzo al quale si distinguono facilmente le cellule della sierosa proliferate. Là dove la placca non aderisce al fegato, le cellule della sierosa hanno assunta la forma cilindrica (fig. 3, tav. V), mentre a distanza della neoformazione vanno man mano riassumendo l'aspetto normale.

Le formazioni cistiche esistenti nelle neoformazioni del fegato hanno una struttura meglio definita che non quelle del tumore principale. Hanno aspetto differente a seconda che sono tagliate verso la periferia o verso il centro e fanno vedere le cellule allungate, in forma cilindrica, disposte in più strati, con disposizione nettamente radiale.

L'altezza di questo strato di cellule, che costituisce la parete cistica, non è da per tutto uguale, ma dove maggiore, dove minore. La grandezza di queste formazioni è anche molto varia. Raramente verso la periferia di alcune di queste cisti ho veduto qualche cellula gigante, con nuclei strettamente ravvicinati al centro e con un alone di protoplasma libero verso la periferia.

Il tessuto esistente fra queste formazioni cistiche è costituito da cellule aventi lo stesso aspetto, con tendenza a disporsi intorno ad esse, in guisa da circoscriverle. Qua e là però riprendono la disposizione e la forma delle cellule che costituiscono la parte principale del tumore.

Nè nelle neoformazioni del fegato, nè nel tumore principale si osservano fasi regressive.

Il grande omento, là dove non presenta neoformazioni, è più o meno ispessito per la infiltrazione più o meno abbondante di cellule aventi gli stessi caratteri delle cellule costituenti il tumore principale. La figura 1, della tavola V rappresenta appunto la sezione del grande omento in uno dei punti infiltrati da cellule neoplastiche e la figura 2 della stessa tavola fa vedere queste cellule a forte ingrandimento per dimostrare quanto si allontana dal tipo normale la forma delle cellule neoformate, specialmente di quelle situate alla superficie.

Le neoformazioni esistenti sulla superficie inferiore del diaframma presentano la stessa struttura di quelle del fegato.

Neoformazioni cistiche, come quelle innanzi descritte, isolate o a gruppi, si osservano qua e là sulla superficie peritoneale dell'intestino tenue, nel connettivo che circonda il pancreas ed i reni.

Nel parenchima epatico si vedono qua e là piccole chiazze di cellule della stessa natura di quelle, che costituiscono il tumore principale, qualche volta nettamente separate le une dalle altre, qualche altra con corpi protoplasmatici fusi.

Alla periferia di alcune di queste chiazze vi sono cellule appiattite endoteliali, le quali dimostrano che questi gruppi di cellule hanno sede nei capillari.

Nessuna alterazione vi è nei reni e nella milza.

Nelle glandole linfatiche retroperitoneali, specialmente verso la periferia, vi sono gruppi più o meno estesi di cellule (figure 4-5, tav. III) perfettamente identiche a quelle del tumore principale ed a quelle esistenti nel parenchima epatico. In alcune glandole linfatiche buona parte della sostanza glandolare è sostituita dal tessuto di neoformazione, in altre quasi tutto il tessuto glandolare è sostituito dal tessuto di neoformazione e la struttura della glandola linfatica non si riconosce, se non per qualche residuo di tessuto linfoide.

Nei polmoni, specialmente in rapporto con le pareti connettivali dei vasi sanguigni, vi sono gruppi più o meno estesi di cellule, aventi gli stessi caratteri delle cellule costituenti il tumore principale e le neoformazioni osservate nel parenchima epatico e nelle glandole linfatiche addominali. In queste neoformazioni di tessuto del parenchima epatico, delle glandole linfatiche e dei polmoni non ho riscontrato la esistenza di formazioni cistiche identiche a quelle del tumore principale, della superficie del fegato e del grande omento.

Il *secondo cane inoculato* con soli prodotti dal Sacch. canis II è morto dopo 56 giorni ed alla autopsia ha presentato un tumore nel grande omento, della grandezza di una castagna, scarsi noduli disseminati nel grande epiploon. glandole linfatiche addominali ingrossate, niente di notevole nel fegato e nella milza. Nella sostanza corticale dei reni si osservano chiazze di colorito bianco-gialliccio che in alcuni punti occupano quasi tutta la spessezza della sostanza corticale. Nei polmoni non vi è nulla di notevole. Nessuna traccia d'infiammazione si nota nella sierosa. Il tumore principale, nel grande omento, presenta la stessa struttura di quello del cane precedente, con la differenza, però, che mentre nel primo

cane la massa principale del tumore era costituita da gruppi di cellule, con ampio corpo protoplasmatico e nucleo vescicolare ed erano piuttosto scarse le formazioni cistiche, nel tumore di questo secondo cane la parte principale del tumore è costituito dalle neoformazioni cistiche e la parte minore dai gruppi di cellule innanzi descritte. Gli elementi propri del tumore, disposti nel modo detto innanzi, in gruppi più o meno estesi, sono separati da fasci connettivali, più o meno fitti, nei quali si riscontrano, come nell'altro tumore, i vasi sanguigni. Le formazioni cistiche presentano tutte le particolarità di struttura innanzi descritte ed hanno, nelle sezioni in serie, aspetto diverso, a seconda che sono tagliate verso la periferia o verso il centro.

Nel tessuto adiposo del grande epiploon, nel connettivo che circonda il pancreas, in quello che circonda i reni vi sono neoformazioni numerose, le quali, ora hanno lo stesso aspetto delle neoformazioni cistiche che si trovano nel tumore principale, ora presentano, in tutta la serie delle sezioni, l'aspetto di formazioni solide, senza cavità centrale, con elementi cellulari disposti in gruppi diversamente estesi, divisi da scarse fibrille connettivali (fig. 6, tav. III).

Nelle glandole linfatiche addominali a differenza di ciò che si è notato nel primo cane, non si vedono neoformazioni costituite dagli stessi elementi cellulari del tumore principale. Nulla di notevole si vede nel fegato e nella milza. Nella sostanza corticale dei reni vi sono neoformazioni costituite da cellule dello stesso aspetto di quelle, che costuiscono la parte meno sviluppata del tumore principale ed alla periferia di queste neoformazioni vi sono numerose sezioni di tubuli uriniferi, con epitelio giovane, affatto diverso da quello che riveste i tubuli uriniferi normali. Nelle sezioni capitate verso la periferia di queste neoformazioni si riscontrano solamente le sezioni dei canalini uriniferi neoformati (fig. I, tav. VI).

Nelle sezioni dei polmoni non vi è nulla di notevole.

Il *terzo cane inoculato in addome* con soli prodotti del Sacch. canis II è morto dopo 15 settimane. Alla autopsia si è trovato un tumore grande quanto un uovo di pollo, nel grande epiploon (fig. 2, tav, I) e molti noduli disseminati nel grande omento. Le glandole linfatiche addominali erano molto ingrossate. Il fegato e la milza erano normali. I reni presentavano, nella sostanza corticale, numerose neoformazioni simili a quelle descritte nel cane precedente. I polmoni apparivano normali.

Istologicamente il tumore principale ha la stessa struttura del tumore osservato nel primo cane. Interessantissimo è il reperto istologico di alcune glandole linfatiche addominali, perchè vi sono neoformazioni aventi la identica struttura delle neoformazioni cistiche che si trovano nel tumore principale. Il centro di queste neoformazioni cistiche è occopato da una sostanza ialina con abbondante detritus nucleare. Le neoformazioni renali hanno la stessa struttura di quelle descritte nel secondo cane. Niente di notevole vi è nel fegato, nella milza, nei polmoni.

Dopo aver fatta la esposizione dei reperti ottenuti nei cani, con la inoculazione nella cavità addominale dei prodotti elaborati in vitro dai blastomiceti patogeni, è necessario, prima di procedere oltre, fare *alcune considerazioni*. Innanzi tutto bisogna rispondere al

quesito, *se le lesioni innanzi descritte appartengono alla categoria dei tumori di granulazione ovvero sono dei veri tumori.*

La struttura dei tumori di granulazione è così varia, che si può facilmente distinguere da quella dei veri tumori. La somiglianza della loro disseminazione per mezzo di metastasi è solamente apparente. Il tubercolo, l'actinomicosi, la gomma, il morbo perlato dei bovini ed una serie di altri processi si distinguono dai veri tumori, in quanto le metastasi sono dovute al fatto che il parassita dal sito primitivo di sua localizzazione perviene in altre parti del corpo e stimola il tessuto, ivi esistente, alla proliferazione. Si originano, a questo modo, neoformazioni identiche a quelle primitive, perchè date dal tessuto connettivo, il quale si trova in tutto l'organismo. Se invece dà metastasi un condroma, nelle metastasi troviamo lo stesso tessuto cartilagineo, qualunque sia l'organo, nel quale queste si sviluppino. Le metastasi sono, quindi, dovute a particelle del tumore primitivo emigrate per mezzo delle correnti linfatiche o sanguigne. Nel caso di tumori di granulazione avviene metastasi del parassita, nel caso dei veri tumori avviene metastasi di elementi cellulari del tumore stesso.

Mentre per le ragioni dette i veri tumori si distinguono dai tumori di granulazione, vi sono casi, in cui la distinzione presenta qualche difficoltà, specialmente, quando l'agente infettivo non è più dimostrabile.

Nelle infiammazioni croniche qualche volta hanno luogo proliferazioni epiteliali o endoteliali in modo da originarsi delle immagini microscopiche, che hanno grande somiglianza coi veri tumori, ma in questi casi non si hanno metastasi negli organi e quindi questi processi non possono confondersi con quelli che innanzi abbiamo descritto nei cani. E' noto che alcune proliferazioni infiltrate della pleura che altri osservatori ritengono come tumori originatisi dagli endoteli (*alias* epiteli) sono ritenuti dall'Hansemann come prodotto di una infiammazione cronica. D'altra parte non si può negare che alcune forme di sarcomi presentano grande somiglianza coi prodotti di una infiammazione cronica, anche di natura specifica.

Prima di tutto la omogeneità degli elementi cellulari riscontrati nei tumori dei cani, simili nel nucleo e nel corpo cellulare, è già un carattere abbastanza importante che distingue i tumori innanzi descritti da un tessuto infiammatorio, nel quale le più diverse forme di cellule connettivali giovani sono frammiste a corpuscoli bianchi del sangue di tutte le forme, nel quale vi è grande ineguaglianza delle cellule ed abbondante presenza di fibrina.

Le neoformazioni osservate nel grande epiploon intorno ai tumori principali dei cani, le placche riscontrate sulla superficie superiore del fegato del primo cane, le neoformazioni descritte nel connettivo che circonda i reni, il pancreas, si possono facilmente intendere, quando noi sappiamo che i tumori maligni possono dare metastasi o per propagazione, diretto passaggio da un organo all'altro, o per disseminazione, dissoluzione di particelle del tumore che si annidano in altri siti, ciò, che accade specialmente nelle cavità sierose, per esempio nello addome, dove le cellule di un tumore emigrano, finchè, trovando un ostacolo, non si fermano, dando luogo allo sviluppo di un altro tumore o finalmente per trasporto delle cellule neoplastiche per la via sanguigna e linfatica.

Nel caso, di cui parliamo, le metastasi sono dunque avvenute per disseminazione. *Le metastasi presentano la stessa struttura del tumore principale*, anzi possiamo dire che esse presentano i caratteri del tumore originario in forma più chiara, ciò, che è un carattere speciale delle metastasi in genere dei tumori maligni.

Così si può facilmente osservare che un carcinoma epiteliale piatto con limitata corneificazione dà nelle metastasi una grande quantità di perle cancerigne.

Quanto alle metamorfosi presentate dalle cellule della sierosa in corrispondenza delle neoformazioni sviluppatesi sulla superficie superiore del fegato del primo cane, sappiamo che in molte proliferazioni infiammatorie ed in molti processi neoplastici degli endoteli queste cellule si possono trasformare in cellule cubiche o cilindriche. Il Borst in tumori multipli peritoneali vide l'endotelio peritoneale che rivestiva le introflessioni della superficie sierosa trasformato in elementi cubici, in modo da originarsi numerose cisti piccole e grandi, con contenuto colloidalc e con rivestimento di cellule alle volte cubiche, alle volte piatte. Anche l'Hansemann ha osservato un tumore originatosi dal peritoneo con metastasi nella pleura, nel quale le cellule si presentavano aggruppate intorno alle cellule adipose del mesentere, in modo da rivestirle formando piccole cisti, nelle quali l'epitelio rivestiva non la superficie interna, ma la esterna.

In questi tumori si possono anche formare delle neoformazioni simili a glandole, come quelle osservate nel tessuto cellulo-adiposo dell'omento del secondo cane, con rivestimento cubico-cilindrico.

Giustamente il Ribbert riconosce nelle suddette metamorfosi delle cellule di rivestimento delle cavità sierose un ritorno alle forme che possedevano nello sviluppo dell'embrione e ciò in appoggio dell'origine epiteliale degli endoteli.

Abbiamo già descritte le formazioni cistiche nei tumori dei cani ed abbiamo or ora veduto che queste stesse formazioni sono state riscontrate in tumori della cavità peritoneale dell'uomo.

Non è possibile ammettere che le lesioni prodotte nei cani sieno da spiegarsi come quelle che si originano in seguito alla inoculazione di corpi estranei nella cavità addominale degli animali. Se così fosse avremmo dovuto osservare le stesse neoformazioni nei cani che erano stati inoculati nella cavità addominale con il solo substrato di nutrizione sterile senza vegetazione di parassiti, ciò che non si è verificato, come innanzi si è detto. I corpi estranei, come i veri tubercoli, si possono circondare di un mantello di tessuto di granulazione con cellule giganti in grande quantità. Cellule giganti si possono formare intorno alla sostanza amiloide, intorno alle perle del concroide, nell'echinococco multiloculare, nel tessuto di granulazione del calazion. Innanzi si è visto che solo eccezionalmente si sono riscontrate vere cellule giganti nei tumori dei cani e non di quelle del tipo di Langhans, coi nuclei alla periferia, ma con nuclei ravvicinati strettamente fra loro e situati nel centro del corpo protoplasmatico.

Ciò che toglie ogni dubbio sulla natura delle lesioni osservate nei cani è il fatto di avere riscontrato nelle glandole linfatiche, nei reni, nel fegato e nei polmoni neoproduzioni cellulari, aventi gli stessi caratteri del tumore principale. Avendo inoculato solamente prodotti solubili, queste neoproduzioui non possono esseve dovute che ad elementi cellulari emigrati dal tumore primitivo e trasportati negli organi per mezzo della corrente linfatica e sanguigna.

Devono quindi queste neoformazioni essere considerate come vere metastasi.

Il *carattere fondamentale delle cellule dei tumori maligni*, il quale le distingue da tutte le altre cellule patologiche e normali dell'organismo è quello d'infiltrarsi fra i tessuti normali e di produrre metastasi. Le cellule normali dell'organismo possono vivere in determinati siti ed in rapporto con determinati tessuti. Pezzi di periostio innestati nei polmoni crescono per poco tempo e poi sono riassorbiti. Se tessuti di diversa natura si pongono nella camera anteriore dell'occhio di un animale in un primo tempo si vascolarizzano e poi muoiono.

Tutti gli esperimenti di trapianto dei tessuti embrionali hanno dimostrato che ben presto questi tessuti sono riassorbiti.

Le cellule dei tumori maligni, al contrario, hanno la proprietà di svilupparsi nei siti più diversi e negli organi più diversi. Se esse

si liberano dal tessuto materno e per mezzo della corrente linfatica o sanguigna pervengono in altri organi, possono ivi moltiplicarsi, disporsi nella medesima maniera e dare origine ad una trasformazione, identica al tumore principale. Queste cellule dei tumori maligni hanno perduto nella differenziazione ed hanno acquistato il potere di esistere individualmente, ciò che il v. Hansemann, il più competente in fatto di oncologia, esprime con la parola *anaplasia*. Quando si dice che una cellula è anaplastica, si vuole significare che essa è meno differenziata della cellula madre, ma possiede in cambio un potere di vivere a sè superiore a quello della cellula madre. Ora, per quale ragione è diminuita la differenziazione ed è aumentata la individualizzazione delle cellule dei tumori maligni? Questo non spiega il v. Hansemann. La teoria dell'anaplasia è una teoria istogenetica, non etiologica. La etiologia non ha nulla a che fare con la istogenesi, perchè la infezione, il momento etiologico, precede la modificazione patologica del tessuto. La ricerca microscopica non costituisce che una parte ben limitata di tutto il vasto problema, che riguarda la genesi dei tumori maligni.

Importantissimi sono i lavori del Thiersch, del Waldeyer, dell'Hauser, del Borrmann sulla istogenesi di alcuni tumori, ma essi non portano alcun contributo alla etiologia.

Neanche la teoria del Ribbert che è istogenetica e vorrebbe essere etiologica al tempo stesso, spiega la genesi dei tumori maligni. Il Ribbert sostiene che la causa del carcinoma è una proliferazione infiammatoria, per cui avviene il dislocamento di alcune cellule epiteliali, che danno luogo al tumore. In quante infiammazioni avviene il dislocamento di cellule epiteliali e pure non si sviluppano tumori!

Sono dunque dei processi infiammatori speciali quelli che danno origine ai tumori e quale è la causa di questi processi infiammatori? E quanti tumori vi sono che si sviluppano senza alcuna traccia d'infiammazione! E quanti neoplasmi si osservano, come lo stesso v. Hansemann afferma, nei quali non si vedono modificazioni anaplastiche delle cellule, quantunque clinicamente i tumori fossero maligni!

Queste eccezioni non possono che generare scetticismo, anche quando le teorie sono state formulate da oncologi di valore.

Prima delle modificazioni istologiche devono entrare in azione stimoli chimici capaci di spingere alla proliferazione gli elementi cellulari. Questi stimoli non possono essere prodotti che da microrganismi, come negli altri processi patologici infettivi.

Ora dagli esperimenti innanzi riferiti si deduce che *i blastomiceti nelle colture e nell'organismo sono capaci di produrre delle sostanze capaci di stimolare gli elementi cellulari alla proliferazione, con la formazione di vere neoplasie, dalle quali si distaccano poi cellule, che portando con sè lo stimolo continuano a moltiplicarsi nelle glandole linfatiche, nel fegato, nei polmoni,*

Ammessa, in base a questi risultati, la proprietà nei blastomiceti di stimolare coi loro prodotti le cellule alla neoformazione, bisogna dedurne che la cellula una volta modificata nel suo biochimismo si moltiplica e continua a moltiplicarsi, finchè non si è liberata del prodotto, che l'ha disturbata alterandone la forma e la funzione (anaplasia).

Il fattore etiologico dei tumori maligni, rappresentato dai blastomiceti patogeni esistenti sulle mucose o sulla cute, o eccezionalmente nell'interno dell'organismo, agisce nel momento in cui le cellule, per diminuita resistenza, ne permettono la moltiplicazione e la consecutiva azione stimolante dei prodotti alla proliferazione atipica. In seguito è la cellula stimolata che rappresenta il fattore della neoplasia.

Ed il fatto che le cellule dei tumori maligni contengono qualche sostanza capace di stimolare le cellule dell'organismo alla neoproduzione è dimostrato dalle ricerche importanti del Lewin innanzi citate. Le metastasi prodotte dal Lewin nel fegato e nei polmoni dei cani inoculati nell'addome con cellule cancerigne dell'ovaia, come risulta dalle figure annesse a' lavoro, sono molto somiglianti a quelle prodotte nei cani inoculati in addome coi prodotti solubili dei blastomiceti.

In base al concetto che la cellula una volta stimolata acquista una data potenzialità di riproduzione capace di estrinsecarsi nel sito, ove è avvenuto lo stimolo ed anche a distanza, si spiega facilmente, come qualche volta sia riuscita la inoculazione di tumori da animale ad animale della stessa specie. S'intende poi che non tutti i tumori sono riproducibili da animale ad animale, ma solamente quelli, le cui cellule presentano nel momento del trapianto la potenzialità riproduttiva per lo accumulo dei prodotti, di cui non ancora si sono liberate.

Si potrebbe obbiettare che le neoproduzioni delle glandole linfatiche, del fegato, dei reni e dei polmoni dei cani inoculati in addome coi prodotti solubili dei blastomiceti, alle quali ho dato il significato di metastasi, non sono tali, ma alterazioni locali di natura infiammatoria dovute alle sostanze elaborate *in vitro* dai bla-

stomiceti e penetrate nel circolo. Non credo che tale obbiezione possa aver valore, prima di tutto perchè le neoformazioni osservate negli organi presentavano una struttura istologica simile a quella dei tumori principali, con elementi cellulari, come ad esempio quelli delle neoformazioni cistiche, che non si riscontrano mai nè nelle glandole linfatiche normali, nè in quelle colpite da granulomi infettivi. Non si possono quindi spiegare altrimenti queste neoformazioni se non per moltiplicazione delle cellule distaccate dai tumori principali e pervenute negli organi. In secondo luogo se queste alterazioni fossero dovute ai prodotti solubili penetrati in circolo, dovrebbero essere molto più diffuse. Invece si è trovata la maggiore lesione nel grande omento con diffusione secondaria di noduli all'intorno, con consecutive neoproduzioni negli organi. Il processo patologico ha proceduto quindi a tappe, proprio come nei tumori maligni.

In terzo luogo non essendo stati inoculati microrganismi, ma particelle di substrato nutritivo contenenti i prodotti solubili dei blastomiceti, queste si sono fermate nel grande omento, dando luogo al tumore principale e negli organi non sono state certo esse ad emigrare, perchè altrimenti vi si sarebbero riscontrate, ma solamente le cellule distaccatesi dalle neoformazioni principali.

Delle due l'una: o questi processi patologici devono entrare a far parte della oncologia sperimentale, o bisogna aprire un nuovo capitolo di anatomia patologica, nel quale comprenderli. Spetta agli anatomisti patologici l'ultima parola.

Ammesso in base agli esperimenti fatti che i parassiti coi loro prodotti agiscono in un primo tempo sulle cellule stimolandole alla moltiplicazione e che in seguito il tumore si svolge per la loro morbosa attività proliferativa, si spiega il numero scarso di parassiti che si riscontra nei tumori specialmente di lunga durata e la possibile loro assenza nelle metastasi.

Dal processo anatomo-patologico, in cui vi è rapida ed abbondante moltiplicazione dei parassiti e reazione scarsa da parte delle cellule dell'organismo (blastomicosi diffuse) si passa al processo patologico, nel quale i parassiti sono scarsissimi o mancano del tutto (intossicazioni sperimentali) e la reazione da parte del tessuto non è che il risultato dell'azione di prodotti solubili. Il quadro della infezione e della intossicazione da parte dei blastomiceti rientra quindi nelle leggi generali che regolano l'azione patogena di tutti i microrganismi finora conosciuti.

Ed ora è necessario dire *come devono essere classificati i tumori*

osservati nei cani. Le cellule che rivestono le cavità sierose da alcuni sono considerate come endoteliali, da altri invece come epiteliali. Il Marchand ed il Benda sono tra gli ultimi e perciò considerano i tumori che si originano dalle cellule di rivestimento delle sierose come carcinomi. Il Borst invece è tra i primi.

Certo si è che gli endoteli prendono un posto intermedio tra le cellule epiteliali e le cellule connettivali, mostrando in condizioni normali e patologiche una grande variabilità. Per questa ragione gli endoteliomi da alcuni sono considerati come tumori epiteliali, da altri come connettivali. Il Ribbert molto logicamente conserva la distinzione fra epitelio ed endotelio. Partendo da criteri morfologici egli distingue come endotelio una membrana sottile, ad un solo strato di cellule appiattite, comprendendovi le cellule delle cavità sierose, dei vasi sanguigni e linfatici e delle lacune connettivali.

I tumori che abbiamo osservato nei cani possono essersi sviluppati dalle cellule di rivestimento della sierosa, come dagli endoteli delle lacune linfatiche del grande omento. Tanto nel primo caso, quanto nel secondo vanno classificati fra gli endoteliomi. Alcuni autori allo endotelioma delle cavità sierose dànno il nome di cancro endoteliale e lo distinguono dagli altri endoteliomi per la sua diffusa estensione e per il suo sviluppo speciale. Tali tumori hanno descritto il Wagner, lo Schulz, il Thierfelder. Si tratta in questo caso di un processo neoplastico, più o meno diffuso a tutta la superficie di una cavità sierosa, che dà luogo ad ispessimenti bianchicci, a proliferazioni granulose e nodulari, fino alla formazione di grandi masse nodose, così come le abbiamo osservate nei cani. Tutte queste neoformazioni sono limitate alla sierosa e non penetrano nel parenchima degli organi posti al di sotto della sierosa, come abbiamo veduto per le placche esistenti sulla superficie del fegato del primo cane. Non raramente si trovano metastasi. Il Glockner riscontrò metastasi nelle glandole linfatiche regionali, nel fegato, nei reni, nel pericardio, nella muscolatura, nel miocardio, nelle capsule surrenali, nel bacinetto renale e nella vescica. Ordinariamente insieme col processo neoplastico vi è una infiammazione cronica con depositi fibrinosi, che porta a molteplici aderenze degli organi.

Negli endoteliomi delle cavità sierose si riscontrano molte deviazioni dal tipo delle cellule endoteliali piatte, come ad esempio grossi elementi polimorfi, simili a cellule epiteliali, con nuclei vescicolari e protoplasma abbondante, granuloso, forme cellulari cilindriche, gruppi più o meno estesi di cellule epitelioidi.

Come *esempio di un endotelioma delle cavità sierose nell'uomo* riferirò quello osservato dal Borst, perchè presenta molte analogie con le lesioni osservate nei cani.

Si trattava di una neoplasia estesa a tutta la sierosa peritoneale. Nel peritoneo il tumore appariva in forma di noduli grandi e piccoli, di piastre confluenti, di proliferazioni papillari. Il tumore non penetrava nel parenchima degli organi addominali. Tutta la superficie della sierosa era cosparsa di cisti di varia grandezza, con contenuto colloide o siero-mucoso. Specialmente il cavo retto-uterino e quello vescico-uterino erano pieni di tali cisti e l'omento ed il mesocolon erano trasformati in una massa neoplastica con parecchie cisti. Vi erano molte aderenze di origine infiammatoria.

Anche il diaframma era preso dalla neoplasia e presentava nella superficie inferiore nolti noduli. Vi erano metastasi nelle glandule linfatiche retro-sierose ed iliache. Le cisti presentavano cellule cubiche o piatte in un solo strato. Il loro contenuto colloide o mucoso era dovuto ad un processo secretivo da parte delle cellule di rivestimento. Il tumore che aveva invaso pure i vasi linfatici della sierosa aveva in alcuni punti struttura alveolare con cellule polimorfe; in altri punti disposizione a rete, come in un endotelioma delle lacune linfatiche. Le cellule in massima parte erano epitelioidi, qua e là riunite in masse sinciziali ricche di protoplasma, con grossi nuclei. Vi erano anche formazioni glandulari sviluppatesi nei più grossi vasi linfatici del diaframma, con elementi cellulari cubici o cilindrici. In alcuni punti le cellule erano poligonali, senza sostanza interstiziale, disposte a mosaico, come negli alveoli di un carcinoma.

In altri siti le cellule erano appiattite, riunite in formazioni stratificate. Questo caso dimostra la pleomorfia degli endoteliomi e specialmente di quelli delle cavità sierose.

Vediamo ora che cosa fanno *le cellule endoteliali nei processi d'infiammazione cronica*. In questi processi il Marchand vide derivare dalle cellule endoteliali peritoneali grosse cellule sferiche e grossi conglomerati cellulari di elementi rigonfiati, nei quali si formavano spazi vuoti per confluenza di vacuoli. Nelle protratte infiammazioni delle cavità sierose il Borst vide formarsi proliferazioni granulose di cellule polimorfe, spesso a più nuclei, nelle quali spesso vi erano stratificazioni cellulari concentriche. L'Hamerl, il Graser ed altri hanno osservato che nelle infiammazioni croniche le cellule endoteliali prendono parte alla formazione del tessuto di granulazione. Nelle infiammazioni specifiche, specialmente tubercolari, le cellule endoteliali si trasformano in cellule epitelioidi e cellule giganti. Il Cornil e lo Chaput nelle infiammazioni sperimentali delle cavità sierose e nella organizzazione delle emorragie semplici, dalle cellule endoteliali videro originarsi elementi cellulari grossi, provvisti di prolungamenti. Il Ranvier ed il Paltauf osservarono che le cellule

endoteliali delle cavità sierose sono capaci di formare sostanza intercellulare.

Dati i molteplici aspetti che le cellule endoteliali delle cavità sierose possono assumere nelle infiammazioni croniche alquanto simili a quelli che si riscontrano nelle neoplasie, s'intende facilmente come in qualche caso possa essere difficile la diagnosi differenziale anche da parte di valenti anatomisti patologi. Non sono tanto importanti le proprietà date come caratteristiche degli endoteliomi cioè la degenerazione mucosa, ialina ed amiloide e la presenza di formazioni cellulari stratificate, quanto la presenza delle metastasi.

*
* *

Tre dei *cani inoculati in addome con parassiti vivi e prodotti* hanno dato risultato positivo; il quarto, ucciso dopo alcuni mesi, non ha presentato nulla di notevole.

Il primo cane è morto dopo cinquanta giorni ed alla sezione si trovarono più tumori nel grande epiploon, della grandezza oscillante fra una castagna ed un fagiuolo; glandole linfatiche mesenteriali alquanto ingrossate; nulla nel fegato, nella milza e nei reni. Nei polmoni si riscontravano piccole chiazze di epatizzazione.

I tumori del grande epiploon erano della medesima struttura di quelli innanzi descritti. Nelle glandole linfatiche addominali non ho riscontrato metastasi.

Piccoli noduli metastatici si vedevano nel connettivo intorno al pancreas. Nel fegato e nella milza non si osservava nulla. Nei polmoni vi erano metastasi della medesima struttura dei tumori principali.

Gli altri due cani sono morti dopo 48 e 65 giorni con lo stesso reperto anatomo-patologico ed istologico degli altri cani e quindi mi risparmio dal dilungarmi in descrizioni.

In due precedenti lavori (1-2) descrissi due casi di tumori sviluppatisi nella mucosa prepuziale dei cani. Il primo dei cani inoculato con coltura pura di blastomicete patogeno nel connettivo sottocutaneo in vicinanza dei testicoli presentò alla autopsia praticata dopo cinque mesi al posto dei testicoli una massa di tessuto neoformato, di colore bianco-gialliccio, di consistenza piuttosto molle ed intorno al pene numerosi noduli dello stesso aspetto della massa principale del tumore, alcuni grandi quanto una nocciuola, altri quanto piselli; intorno alla estremità del pene vi era una massa neoplastica conica. Il secondo cane, inoculato anche nel connettivo sottocutaneo in vicinanza dei testicoli, morì dopo quattro mesi ed alla autopsia presentò un tumore composto di più noduli di varia gran-

---

(1) *Ueber die pathogene Wirkung der Blastomyceten*. V. Abhandlung. Zeitschrift f. Hygiene. 1898.

(2) *Ueber die pathogene Wirkung der Blastomyceten*. VI. Abhandlung. Zeitschrift f. Hygiene. 1903.

dezza, aventi sede nel connettivo sottocutaneo del prepuzio. La diagnosi in base alla osservazione del secondo cane, nel quale il tumore si era sviluppato dal connettivo della mucosa del prepuzio, fu quella di Sarcoma. Certo non si poteva fare la istogenesi di questi tumori con un numero così scarso di osservazioni. Con altri due casi degli stessi tumori che ho avuto in questi ultimi mesi ho potuto stabilire bene il modo come si sviluppano queste neoplasie.

Se si osserva la mucosa prepuziale dei cani normali si vedono alla superficie della mucosa tanto parietale, quanto viscerale dei noduletti grandi come teste di spillo, alquanto sporgenti, di colorito biancastro. Facendo delle sezioni in serie di questi piccoli noduli perpendicolarmente alla superficie della mucosa si vede che essi sono dovuti ad accumuli di elementi linfoidi che sollevano alquanto l'epitelio di rivestimento della mucosa. La mancanza di epitelio secernente, la mancanza di dotti escretori, la somiglianza degli elementi che li costituiscono con gli elementi linfoidi fanno escludere la idea che possa trattarsi di glandole e fanno ammettere con molta probabilità quella che si tratti di piccoli follicoli linfatici. Nei trattati di anatomia del cane non ho trovato alcun cenno di queste formazioni. Certo si è che i tumori già descritti e quelli che or ora descriverò si originano dagli elementi cellulari che costituiscono queste formazioni.

Un *primo cane inoculato nel connettivo sottocutaneo* in vicinanza del pene con soli prodotti del *Saccharomyces canis II* fu ucciso dopo un mese e si trovarono specialmente sulla mucosa prepuziale parietale molto ingrossati i piccoli noduli, di cui innanzi si è detto. Dapprima si credette che questo considerevole ingrossamento non stesse in rapporto con la inoculazione fatta e perciò si osservarono le mucose prepuziali di tutti i cani che si ammazzarono (circa un centinaio) nel canile municipale. Non si trovò in nessun cane un reperto simile. Nel cane inoculato i noduli erano quattro volte più grandi del normale e mentre nelle mucose normali sono bene distinti gli uni dagli altri in modo da serbare la forma rotonda di teste di spillo, nel cane inoculato erano giustaposti in guisa da toccarsi gli uni cogli altri con facce piane, perdendo la forma rotonda. Nelle sezioni di questi noduli in mezzo agli elementi linfoidi si vedevano le cellule caratteristiche della neoplasia evoluta, disposte a gruppi più o meno estesi, circondati da elementi d'infiltrazione.

L'*altro cane inoculato nel connettivo sottocutaneo* in vicinanza del pene con i prodotti dello stesso blastomicete è morto dopo 15 settimane ed ha presentato un tumore impiantato sulla mucosa prepuziale parietale (fig. 1, tav. I) della grandezza di un piccolo uovo di pollo, con superficie anfrattuosa come quella di un cavolofiore. Nessuna lesione si riscontrava nei testicoli. Nella cavità addominale non si osservava nulla di notevole. I polmoni apparivano normali.

Le sezioni del tumore facevano vedere al di sotto dell'epitelio della mucosa gli elementi propri del tumore costituiti da cellule ugualmente conformate, con nucleo intensamente colorato e corpi protoplasmatici non ben distinti. Parecchi degli elementi costituenti il tumore erano in divisione mitotica atipica. Gruppi più o meno estesi di cellule neoplastiche erano separati da scarse fibre connettivali. L'epitelio della mucosa è enormemente disteso dalla moltiplicazione degli elementi del tumore ed in tal modo forma

tutte quelle anfrattuosità, che dànno alla superficie della neoplasia l'aspetto di cavolofiore.

L'epitelio della mucosa non prende quindi parte attiva alla formazione del tumore. La diagnosi istologica è quella di sarcoma a cellule rotonde. Credo certamente che un tumore della stessa natura sia capitato in osservazione allo Sticker, il quale ha poi fatto numerose esperienze di inoculazione attraverso molte generazioni di cani.

In circa quattro anni ho avuto opportunità di osservare due altri casi di questo sarcoma del pene sviluppatisi spontaneamente in due cani da caccia uccisi nel canile municipale. In uno il tumore era più voluminoso di quello innanzi descritto ed era ulcerato in più punti. Nell'altro il tumore del pene era della stessa grandezza di quello descritto. Mentre nel primo cane non vi erano metastasi nelle glandole linfatiche inguinali e negli organi della cavità addominale e toracica, nel secondo si osservavano metastasi nelle glandole linfatiche dell'addome e nel fegato. Le glandole linfatiche addominali erano di molto ingrossate ed interamente costituite dagli elementi neoplastici. Nel fegato vi erano noduli di varia grandezza, i più grandi come nocciuole, i più piccoli come piselli, alcuni superficiali, altri profondi, costituiti istologicamente dalle stesse cellule rotonde del tumore principale. Questa ultima osservazione toglie ogni dubbio sulla natura sarcomatosa della neoplasia osssservata nel cane inoculato nel connettivo sottocutaneo in vicinanza del pene con i prodotti solubili del *Saccharomyces canis II*.

Un'*altra inoculazione sottocutanea* con soli prodotti solubili del *Saccharomyces canis II* fu fatta *in prossimità di una mammella di una cagna vecchia*. Per controllo in due mammelle vicine s'inoculò una emulsione di patata sterile in acqua. Parecchi giorni dopo la inoculazione si constatò nella mammella innestata coi prodotti solubili la presenza di un indurimento, il quale dopo tre mesi aveva raggiunto la grandezza di una castagna. Cinque mesi dopo la inoculazione quando il tumore della mammella era diventato grande quanto un uovo di pollo, l'animale fu ucciso. Nelle due mammelle inoculate per controllo non si osservò nulla.

Alla sezione non si riscontrò nulla di notevole negli organi della cavità addominale. Nei polmoni vi erano numerosi noduli, i più grandi come piccoli piselli, i più piccoli come teste di spillo, disseminati alla superficie e nel parenchima. I noduli più grandi superficiali sporgevano di poco sulla superficie dell'organo ed al centro presentavano un leggiero infossamento. Alla sezione apparivano di un tessuto compatto e di colorito bianco. Istologicamente il tumore della mammella aveva la struttura di un adenocarcinoma. Le neoproduzioni esistenti nei polmoni presentavano la stessa struttura del tumore principale. Nel tumore principale la natura adenomatosa della neoplasia era più evidente che non nelle metastasi polmonari.

In queste ultime gli elementi neoplastici erano disposti a zolle più o meno estese, separate le une dalle altre da fibre connettivali. In alcuni punti delle metastasi si vedeva anche la disposizione tubulare degli elementi neoplastici, ma molto meno spiccata che non nel tumore principale.

Su dieci cani inoculati in addome e nel connettivo sottocutaneo con i soli prodotti dei blastomiceti patogeni o con i prodotti ed i parassiti si sono avuti nove risultati positivi. Negli esperimenti precedenti con la inocula-

zione dei soli parassiti non si era mai avuto un numero così elevato di risultati positivi.

Per completare la serie degli esperimenti fatti nei cani riferirò i risultati ottenuti con la *inoculazione endovenosa dei prodotti e dei parassiti*.

Per la inoculazione mi sono servito di una coltura su patata di *Saccharomyces canis II* in tubo chiuso tenuto alla temperatura ambiente due mesi. Si è fatta della coltura una emulsione sottilissima in acqua sterile e si è inoculata in piccola quantità nella vena giugulare. Appena slegati dal tavolo di operazione gli animali si sono mostrati abbattuti per l'embolia prodotta dalla emulsione, ma dopo pochi minuti si sono riavuti e non hanno presentato nulla di anormale nei giorni successivi. Dei tre cani inoculati in vena, il primo è morto dopo 26 giorni, il secondo dopo 30 ed il quarto dopo 42 giorni, mostrando le stesse lesioni. Le alterazioni più importanti si osservano nel fegato, nei reni, nelle glandule linfatiche addominali, nei polmoni, nel cervello. In uno dei cani ho osservato alterazioni anche nel pancreas. Alla superficie e nello interno del fegato sono disseminate numerose chiazze di colorito gialliccio. Simili neoproduzioni si presentano anche nei reni, tanto nella sostanza corticale, quanto in quella midollare. Le glandole linfatiche addominali sono molto ingrossate. La milza anche è aumentata di volume ed alla sezione mostra i follicoli ingrossati. Nel pancreas spiccano sul fondo roseo numerose chiazze biancogiallicce. Nei polmoni sono disseminate le stesse neoformazioni, tanto alla superficie, quanto nella spessezza del parenchima. Nel cervello e nel cervelletto si vedono anche neoformazioni nella sostanza bianca e nella sostanza grigia.

Si tratta di riproduzioni diffuse a tutti gli organi, dovute a quegli stessi elementi cellulari che nei cani inoculati nella cavità addominale costituivano la massa principale del tumore. Il fegato alle volte si presenta così infarcito da queste neoproduzioni, che quasi quasi si direbbe che il tessuto neoformato è in quantità maggiore del tessuto epatico. In queste chiazze di riproduzione non si riscontrano cellule giganti, nè metamorfosi regressive. Il tessuto epatico appare del tutto normale. Solamente in vicinanza del tessuto neoformato vi è una leggiera infiltrazione. Nei reni si riscontrano le stesse neoformazioni, più abbondanti nella sostanza corticale, meno in quella midollare. Nella polpa splenica vi sono anche piccole chiazze di tessuto neoformato, le quali riempiono le maglie del reticolo. Anche in alcuni follicoli vi sono piccoli gruppi di cellule neoplastiche. Alcune glandole linfatiche sono quasi del tutto costituite dal tessuto di neoformazione, altre ne presentano chiazze più o meno estese verso la periferia. Le stesse alterazioni ugualmente estese si osservano nel pancreas (fig. 3. tav. VI).

Numerose neoformazioni si vedono anche nel grande omento (fig. 2. tav. VI). Nei polmoni, specialmente in vicinanza delle diramazioni bronchiali, in vicinanza delle piccole arterie e vene, si vedono molte chiazze di tessuto neoformato. Anche al di sotto della pleura vi è qualche nodulo di neoproduzione. Le neoformazioni che si riscontrano nel cervello e nel cervelletto, sono in rapporto coi vasi sanguigni.

La differenza fra le lesioni dei cani inoculati in vena con soli parassiti e quelle dei cani innanzi descritte, sta nella maggiore diffu-

sione delle neoformazioni in questi ultimi. Il numero dei parassiti nei cani inoculati con parassiti e prodotti è talmente scarso che non mi è riuscito di riottenerli nelle colture.

Sulla natura delle lesioni ho già discusso nei miei precedenti lavori, ritenendole come neoformazioni sarcomatose.

IV.

Esperimenti sui gatti. — *Ho inoculato a questi animali prodotti soli e questi insieme coi parassiti.* — In tutto sono stati inoculati 16 gatti. I primi due furono inoculati nella cavità addominale con i soli prodotti; tre furono inoculati anche nella cavità addominale con parassiti e prodotti. Si fecero inoltre tre esperimenti d'inoculazione nelle vene con parassiti e prodotti, ed otto inoculazioni nella trachea anche con parassiti e prodotti.

Il primo *gatto inoculato in addome con soli prodotti solubili* ricavati da una coltura su patata di *Saccharomyces canis II* in tubo chiuso alla lampada, tenuto in stufa un mese e mezzo, è morto dopo 38 giorni.

Alla sezione si sono riscontrati numerosi noduli nel grande epiploon della grandezza oscillante fra quella di un pisello e di un fagiuolo; si è trovata la milza alquanto ingrandita, il fegato con neoformazioni sulla superficie superiore, alcune delle quali alquanto sporgenti, simili a quelle trovate nel primo cane, le glandole linfatiche mesenteriali molto ingrossate. Nei polmoni vi erano noduli sottopleurali.

Istologicamente i noduli del grande omento hanno la stessa struttura osservata nei tumori addominali dei cani, con la sola differenza che sono molto scarse le formazioni cistiche e non presentano cellule cilindriche a più strati, ma in uno strato solo. Le placche esistenti sulla superficie del fegato sono invece ricche di formazioni cistiche, con cellule cilindriche in più strati. Nel parenchima epatico non vi sono metastasi. Nei reni non vi è nulla di notevole. Nelle glandole linfatiche addominali si sono riscontrate specialmente alla periferia, al di sotto della capsula, chiazze di tessuto perfettamente simile a quello dei noduli esistenti nella cavità addominale. Nella milza e nel pancreas non si sono riscontrate lesioni. Nei polmoni i noduli sottopleurali erano formati dallo stesso tessuto che costituiva le neoformazioni addominali e delle glandole linfatiche.

Il secondo *gatto inoculato anche in addome con soli prodotti di una coltura su patata di Saccharomyces canis II* in tubo chiuso, conservato per tre mesi nel termostato, è morto dopo 41 giorni. Alla sezione si sono riscontrate masse neoplastiche nel grande omento (fig. 4. tav. I), e nel mesentere (fig. 2. tav. II), con aderenze alla parete addominale. Le glandole linfatiche addominali erano numerose e molto ingrossate (fig. 3. tav. I.) Nessuna alterazione si è osservata nel fegato, nei reni e nella milza. Nei polmoni vi erano noduli sottopleurali. La sierosa addominale

non presentava alcuna reazione infiammatoria. Nei polmoni di questo gatto, come in quelli del precedente, non vi erano lesioni da strongili.

La struttura istologica del tumore principale è del tutto identica a quella del gatto precedente. Si nota una considerevole infiltrazione da parte delle cellule neoplastiche del tessuto cellulo-adiposo esistente intorno alle principali masse neoplastiche dell'addome. Nel parenchima epatico vi sono numerose e piccole chiazze di tessuto neoformato, simile a quello dei tumori principali Anche nei reni, tanto nella sostanza corticale, quanto in quella midollare, si osservano piccole neoformazioni. Nelle glandole linfatiche le metastasi sono più estese che non nel gatto precedente. In alcune glandole tutta la sostanza corticale è occupata dal tessuto neoplastico. Nel pancreas anche vi sono piccole metastasi. Nell'intestino tenue i follicoli sono molto ingrossati, ma non presentano cellule neoplastiche. Nulla si osserva nella milza. Nei polmoni, oltre i noduli sottopleurali, vi sono anche noduli in rapporto con piccoli bronchi, arterie e vene.

In conclusione *con l'inoculazione nella cavità addominale dei prodotti dei blastomiceti patogeni si sono prodotte nei gatti delle neoformazioni connettivali, con metastasi negli organi, simili a quelle osservate nei cani.*

Il *primo dei gatti inoculato in addome con prodotti e parassiti* di una coltura su patata di *Saccharomyces canis* I, tenuta 6 mesi alla temperatura ambiente, è morto dopo 50 giorni, ed all'autopsia si è trovato un tumore nell'addome (fig. 4, tav. II) che si estendeva dal fegato alla vescica, della lunghezza di cm. 8, della larghezza di 4, della spessezza media di un centimetro e mezzo. Il tumore era strettamente aderente alla milza in guisa da comprenderla ed in parte anche al fegato. Inferiormente era in massima parte libero e solamente per una parte limitata era aderente alla parete addominale. Il tumore era di colorito bianco-gialliccio e della consistenza della carne di pesce. Indubbiamente questa massa neoplastica aveva avuto origine dal grande epiploon. Le glandole linfatiche addominali erano molto ingrossate. Nel fegato vi erano numerose metastasi superficiali e profonde. La milza appariva di volume normale. Nei reni non si osservava nulla. Nei polmoni vi erano noduli metastasici.

Il tumore principale è costituito da cellule con nucleo vescicolare e corpo protoplasmatico ampio, disposte a zolle più o meno estese, separate da fibre connettivali. In alcuni punti del tumore sono piuttosto numerosi i globi stratificati concentrici, come si osservano nei cancri epiteliali. Simile disposizione concentrica delle cellule del tumore si osserva non solamente intorno a piccoli nidi cellulari, ma anche intorno a piccolissimi vasi. Qua e là nella massa del tumore vi sono chiazze più o meno estese di degenerazione mixomatosa. Là dove la sierosa ha contatto con qualche superficie del tumore mostra l'epitelio a cellule cubiche (fig. 4, tav. VI).

Nel fegato si riscontrano metastasi di varia grandezza. Le più piccole riempiono e dilatano i capillari. Le più grandi hanno forma irregolare. Anche nelle metastasi più grandi, esistenti nel parenchima epatico si osserva la tendenza degli elementi cellulari a disporsi a globi concentrici. Nei reni vi sono metastasi, tanto nella sostanza corticale, quanto in quella midollare.

Nella milza le cellule neoplastiche giacciono nelle maglie del reticolo e sembrano ordinate in serie. Qua e là nella milza si vedono delle cellule giganti con nuclei fusi o ravvicinati strettamente al centro del corpo protoplasmatico. Numerose metastasi si osservano nelle glandole linfatiche addominali, disposte a chiazze nella parte corticale ovvero a semilune (nelle sezioni) al disotto della capsula. Nella parte centrale delle glandole le cellule neoplastiche si sostituiscono ai cordoni di elementi linfoidi midollari. Sulle pareti di alcune anse del tenue vi sono neoformazioni simili a quelle del tumore principale. I follicoli linfatici dell'intestino tenue sono molto ingrossati e presentano chiazze di cellule neoplastiche. Nel midollo delle ossa lunghe non si riscontrano metastasi. Nei polmoni vi sono metastasi sottopleurali e profonde, di varia estensione, aventi la stessa struttura. In vicinanza di alcune di queste metastasi si notano proliferazioni da parte dell'epitelio bronchiale, con deviazione dal tipo morfologico normale. Queste proliferazioni consistono in numerose estroflessioni ed introflessioni con rivestimento di epitelio cilindrico atipico. Si noti che nei polmoni non vi erano lesioni da strongili. Alcune arteriole in vicinanza delle metastasi o comprese in queste hanno la parete usurata e nell'interno mostrano zaffi di cellule neoplastiche, i quali quasi completamente le ostruiscono.

Il ***secondo gatto inoculato in addome con parassiti e prodotti provenienti da una coltura*** di *Saccharomyces canis* I, in tubo chiuso, rimasta pochi giorni nel termostato, è morto dopo 40 giorni, ed ha presentato nella cavità addominale una massa neoplastica nettamente distinta in tre parti (fig. 3, tav. II). Una parte anteriore più grande, della forma e della grandezza di una piccola pera, aderente alla parete muscolare dell'addome; una parte più piccola situata di lato e superiormente alla parte più grande; una terza parte di uguale grandezza della precedente situata a destra ed indietro della massa più grande e legata a questa per mezzo di un grosso picciuolo. Le glandole linfatiche addominali erano considerevolmente ingrossate, raggiungendo alcune la grandezza di una piccola castagna (fig. 1, tav. II). Nel fegato, nella milza e nei reni non si osservava nulla di notevole.

I polmoni presentavano nei bordi posteriori delle piccole chiazze grigiastre. Non vi erano lesioni da strongili.

La struttura istologica della massa neoplastica addominale è perfettamente identica a quella del gatto precedente. Non si sono riscontrate metastasi nel fegato e nei reni. Nelle glandole linfatiche vi erano metastasi tanto nella sostanza corticale, quanto in quella midollare. Vi erano chiazze di cellule neoplastiche che circondavano e sostituivano buona parte dei follicoli. Gli spazi linfatici della sostanza midollare di alcune glandole erano completamente riempiti di cellule neoplastiche. Nella milza non vi erano metastasi. Le neoformazioni sottopleurali del polmone presentavano la stessa struttura del tumore principale. Nel parenchima polmonale anche vi erano piccoli noduli metastasici, in vicinanza di piccoli bronchi e piccoli vasi sanguigni.

Il ***terzo gatto inoculato nella cavità addominale con parassiti e prodotti provenienti da una coltura di Saccharomyces canis I*** è morto dopo 46 giorni, ma alla autopsia non ha presentato nulla di notevole.

I ***gatti inoculati in trachea*** con parassiti e prodotti ricavati da colture

vecchie di blastomiceti patogeni sono morti dopo 18, 21, 41, 48, 56, 67, 88, 114 giorni ed hanno mostrato lo stesso reperto anatomo-patologico ed istologico. La lesione nei polmoni limitata ad uno solo dei lobi o diffusa in più lobi appariva sotto forma di epatizzazione bianco-gialliccio. Guardando la superficie del lobo epatizzato si vedeva una chiazza a bordi ondulati di aspetto tutto affatto diverso da quello del polmone normale. Tagliando il lobo in corrispondenza di questa chiazza appariva nettamente separato il tessuto neoformato compatto dal tessuto polmonare normale spugnoso. Il tessuto neoformato era di consistenza piuttosto tenue e facilmente, passandovi sopra il taglio del coltello, se ne portava via una piccola parte. In alcuni gatti interi lobi del polmone erano costituiti dal tessuto neoformato, in altri solamente parti limitate erano colpite dalla neoplasia.

Negli organi di questi animali morti in seguito alla inoculazione endotracheale ordinariamente non si sono riscontrate lesioni. Solamente nei reni del gatto VIII, morto dopo 114 giorni vi erano dei noduli nella sostanza corticale.

Il tessuto neoformato (fig. 5, tav. VI) è costituito in massima parte da cellule con nucleo vescicolare intensamente colorato e con corpo protoplasmatico ampio, alle volte ben distinto dai corpi cellulari vicini, altre volte fuso con il protoplasma delle cellule vicine. Qua e là in questo tessuto neoformato si vede più o meno abbondante infiltrazione leucocitaria. Nei corpi cellulari non mancano fasi degenerative in forma di chiazze ialine ora più, ora meno estese. Non sono scarse le figure cariocinetiche normali e patologiche.

Fanno parte del tessuto neorfomato anche le cellule alveolari che riempiono fittamente quei pochi spazi alveolari lasciati liberi dalle cellule neoplastiche innanzi descritte. I corpi protoplasmatici di queste cellule presentano numerose chiazze ialine. Questi gruppi di cellule alveolari mostrano leggiera infiltrazione leucocitaria.

Oltre gli elementi cellulari innanzi descrirti prendono parte al tessuto neoplastico anche le proliferazioni dell'epitelio bronchiale, sotto forma di numerose estroflessioni ed introflessioni. L'aspetto dell'epitelio bronchiale proliferato è affatto diverso dal tipo normale.

La maggior parte del tessuto neoformato è costituito dalle cellule di origine endoteliale. Le proliferazioni dell'epitelio bronchiale e delle cellule alveolari devono essere considerate come fatti reattivi. Ora noi sappiamo che tanto nelle infiammazioni acute, quanto in quelle croniche le cellule endoteliali delle membrane sierose e dei vasi sanguigni e linfatici prendono parte alla formazione del tessuto di granulazione. Tutte le metamorfosi, cui vanno incontro queste cellule nelle varie fasi del processo infiammatorio, presentano anche nei tumori che da esse hanno origine. E perciò che noi troviamo negli endoteliomi le stesse varietà di cellule che riscontriamo nel processo d'infiammazione.

Ora le lesioni osservate nei polmoni dei gatti, per le stesse ragioni esposte a proposito delle lesioni osservate nella cavità addominale dei cani, vanno considerate come di natura neoplastica e non come di natura infiammatoria. Si aggiunga che in uno dei gatti si sono osservati noduli nella sostanza corticale dei reni aventi la stessa struttura del tessuto neoformato dei polmoni.

Ed ora per completare la serie degli esperimenti fatti nei gatti devo dire dei risultati delle *inoculazioni endovenose dei parassiti insieme coi prodotti.* Tre gatti sono stati inoculati in vena giugulare con una cultura di *Saccharomyces canis II.*

Il primo gatto è morto dopo 24 giorni con lesioni nel fegato e nei polmoni. Il fegato presentava piccole chiazze giallastre della grandezza di lenticchie. Nei polmoni vi erano piccoli noduli disseminati in tutta la superficie. Istologicamente le lesioni erano perfettamente identiche a quelle osservate nei cani inoculati nella stessa maniera.

Il secondo gatto è morto dopo 38 giorni con ingrossamento delle glandole sottocutanee ascellari ed inguinali, con ingrossamento delle glandole linfatiche addominali, con tumore di milza, la quale presentava la superficie anfrattuosa, con lesioni nei reni sotto forma di noduli, come teste di spillo nella sostanza corticale, con le stesse lesioni nel fegato e nei polmoni. Specialmente interessante in questo gatto è stata la ricerca istologica delle glandole linfatiche sottocutanee ed addominali e del midollo delle orra lunghe. Nelle glandole linfatiche si vedevano chiazze di cellule neoformate che circondavano i follicoli. Gli spazi linfatici midollari erano in alcune glandole riempiti dalle stesse cellule. Nel midollo delle ossa lunghe vi erano le stesse chiazze di cellule identiche a quelle che si vedevano nelle glandole linfatiche. Le lesioni del fegato, dei reni, dei polmoni erano perfettamente simili a quelle dei cani.

Il terzo gatto è morto dopo 55 giorni con lesioni limitate ai reni, ai polmoni ed al cervello. Le lesioni dei reni e dei polmoni non sono diverse da quelle innanzi descritte. Sulla superficie del cervello ed anche del cervelletto vi erano noduli grandi quanto piccoli piselli, alquanto sporgenti. Nelle sezioni se ne vedevano anche in profondità tanto nella sostanza grigia, quanto in quella bianca.

Anche nel cervelletto le neoformazioni si trovavano alla superficie ed in profondità. Istologicamente questi noduli erano costituiti dagli stessi elementi cellulari che si riscontravano nelle lesioni degli altri organi.

I risultati delle inoculazioni endovenose dei prodotti insieme coi parassiti nei gatti sono gli stessi di quelli ottenuti nei cani. La natura delle lesioni che si riscontrano più o meno diffuse negli organi è anche la stessa.

Il numero dei risultati positivi ottenuti nei gatti con la inoculazione dei soli prodotti e di questi insieme coi parassiti è stato di molto superiore a quello avuto nelle precedenti ricerche con la inoculazione dei soli parassiti. Le lesioni prodotte sono state più importanti ed hanno permesso uno studio più accurato ed una diagnosi più certa.

V.

Esperimenti sui conigli. — Comprendono una serie d'inoculazione dei prodotti dei blastomiceti patogeni nel connettivo sottocutaneo e nella cavità addominale, un'altra serie d'inoculazione di prodotti

insieme coi parassiti vivi anche nella cavità addominale, una serie d'inoculazioni di parassiti vivi senza prodotti e finalmente le inoculazioni endovenose di parassiti e prodotti.

Dei *conigli inoculati sottocutaneamente* coi prodotti i due primi sono morti dopo 34 giorni, il terzo è morto dopo 30 giorni. Tutti e tre hanno presentato lo stesso reperto anatomo-patologico. Nel sito d'inoculazione si è riscontrata una raccolta di sostanza purisimile circondata da un tessuto compatto. Le glandole linfatiche inguinali ed ascellari specialmente in vicinanza del sito d'inoculazione erano alquanto ingrossate. Nella cavità addominale si notavano alquanto ingrandite le glandole linfatiche. Nel fegato vi erano noduli superficiali e profondi della grandezza oscillante fra quella di un acino di canape e di una testa di spillo.

Qualche piccola chiazza di tessuto bianco-gialliccio si vedeva nei polmoni. Nulla di notevole vi era nei reni e nella milza.

Le colture fatte dal sito d'inoculazione, dalle glandole linfatiche sottocutanee, dalla milza e dal sangue del cuore sono rimaste sterili. Nel fegato non vi era coccidiosi.

Il tessuto che circondava la massa purisimile al sito d'inoculazione era costituito da cellule con nucleo vescicolare ed ampio corpo protoplasmatico e da scarse cellule giganti. Alcune cellule costituenti la lesione nel sito di inoculazione contengono dei granuli di pigmento giallo-bruno proveniente con molta probabilità dal pigmento bruno della coltura inoculata.

Nelle glandole linfatiche sottocutanee ed in quelle addominali si vedono gruppi più o meno estesi di cellule perfettamente identiche a quelle riscontrate nel sito d'inoculazione. Alcuni gruppi di queste cellule presentano lo stesso pigmento bruno-giallastro che si è riscontrato nelle cellule esistenti al sito d'inoculazione. Le neoformazioni del fegato sono costituite dalle stesse cellule con o senza cellule giganti, circondate da tessuto connettivo leggermente infiltrato.

In vicinanza di queste neoformazioni vi è ricca proliferazione di vasi biliari. Alcune di queste neoformazioni mostrano al centro una massa granulosa con detritus cromatico. Spesso ho veduto nelle guaine connettivali dei vasi sanguigni del fegato gruppi più o meno estesi di cellule aventi gli stessi caratteri di quelle riscontrate nel sito d'inoculazione e nelle glandole linfatiche facilmente riconoscibili alla presenza dei granuli bruno-giallicci nello interno dei corpi protoplasmatici (fig. 1, tav. VIII). Le neoformazioni dei polmoni hanno la medesima struttura di quelle riscontrate nel fegato. In vicinanza di queste neoformazioni si osserva proliferazione dell'epitelio bronchiale con numerose estroflessioni ed introflessioni.

Le lesioni osservate negli organi dei conigli non si possono spiegare altrimenti se non col distacco di elementi cellulari dalla neoproduzione sviluppatasi nel sito d'inoculazione. Queste cellule pervenute con la corrente linfatica nelle glandole linfatiche, nel fegato e nei polmoni hanno ivi riprodotto delle lesioni simili a quelle che esistevano nel connettivo sottocutaneo. E questo fatto è dimostrato oltre che dalla somiglianza delle cellule che costituiscono le lesioni degli organi, anche dalla presenza di granuli di pigmento nelle cellule migrate, identici a quelli che si trovano nei corpi protoplasmatici delle cellule che costituiscono la lesione primitiva.

Per questa ragione le lesioni descritte, quantunque presentino i caratteri di quelle infiammatorie, devono essere avvicinate a quelle di natura neoplastica, non avvenendo la emigrazione di elementi cellulari patologici e la riproduzione delle lesioni a distanza per opera di questi che solamente nelle vere neoplasie.

Gli esperimenti d'*inoculazione di soli prodotti nell'addome* sono stati fatti in sei conigli.

Il primo di questi conigli inoculato con i prodotti di una coltura su patata del blastomicete del Plimmer tenuta quattro mesi in tubo chiuso nel termostato è morto dopo 69 giorni con un reperto anatomo-patologico molto interessante. Nel grande omento vi erano due neoproduzioni di colorito gialliccio, della grandezza di fagiuoli; il peritoneo era liscio, lucente, senza alcuna traccia d'infiammazione. La milza era alquanto ingrossata e presentava sette noduli della grandezza oscillante fra quella di un pisello e quella di un acino di canape. Il fegato era cosparso di numerosi e piccoli noduli, grandi come teste di spillo. Nei polmoni vi erano neoproduzioni sotto forma di chiazze giallastre.

Le colture fatte dagli organi nei terreni liquidi di nutrizione e nei terreni solidi diedero risultato negativo.

Istologicamente le lesioni del grande epiploon sono costituite dallo stesso tipo di cellule che abbiamo descritto precedentemente nei conigli, con scarse cellule giganti.

Le neoformazioni del fegato (fig. 3, tav. IV; fig. 4, tav. VII) costituite dagli stessi elementi cellulari sono circondate da numerose sezioni di dotti biliari. In vicinanza di questi noduli si osservano numerose cellule giganti e parecchie se ne vedono anche in vicinanza di vasi sanguigni e biliari.

Alcuni noduli al centro presentano detritus nucleare.

E' interessante specialmente lo studio delle cellule giganti.

Come è noto il v. Hansemann distingue le cellule giganti in quelle che si riscontrano nei più diversi tumori e che si originano per cariocinesi delle cellule del tumore, con nuclei di varia grandezza, riuniti qualche volta tra loro per mezzo di prolungamenti; in quelle da corpi estranei, come si riscontrano nei tubercoli e nelle gomme, nelle quali i nuclei giacciono alla periferia o ai due poli della cellula (tipo di Langhans); in quelle dei sarcomi delle ossa, nelle quali i nuclei sono omogeneamente distribuiti nella cellula ed alla periferia rimane una zona di protoplasma libero (tipo a mieloplassi).

Qui è da aggiungere che il Becher ammette che le cellule giganti da corpi estranei possono presentare tanto il tipo di Langhans, quanto quello a mieloplassi.

Tutti e due questi ultimi tipi si vedono nelle neoproduzioni del fegato dei conigli. Ritengo certamente che non tutte le cellule giganti che si riscontrano in queste neoformazioni sono dovute agli elementi neoformati, ma una parte specialmente verso la periferia dei noduli è dovuta alle cellule epatiche.

Il parenchima epatico là dove non vi sono lesioni appare normale. Nei reni non vi sono lesioni. Nella milza oltre i noduli che hanno la stessa struttura di quelli del fegato, vi è gran numero di cellule giganti (fig. 1 e 2, tav. IV; fig. 3, tav. VIII) alcune delle quali contengono gli stessi granuli

giallo-brunastri che si vedono nella lesione iniziale. Gli elementi linfoidi di alcuni follicoli sono interamente sostituiti dalle cellule giganti. In altri follicoli solamente una parte più o meno estesa è occupata dalle sopra dette cellule. Anche nel pancreas (fig. 4, tav. VIII) vi sono chiarissime chiazze di cellule neoformate contenenti il pigmento giallo-bruno. Di queste cellule neoformate se ne vedono anche lungo il tragitto dei vasi linfatici. Gli elementi glandolari del pancreas e le isole di Langerhans appaiono del tutto normali. Nelle glandole linfatiche addominali anche vi sono neoproduzioni sotto forma di chiazze, più o meno estere nella sostanza corticale, di cellule pigmentate, aventi gli stessi caratteri di quelle della lesione primitiva. In queste neoproduzioni non ho riscontrate cellule giganti. Nei polmoni le lesioni hanno la stessa struttura istologica e sono accompagnate da considerevole proliferazione dell'epitelio bronchiale e delle cellule alveolari,

Il secondo coniglio inoculato in addome con coltura di *Saccharomyces canis I* tenuto in tubo chiuso nella stufa per tre mesi è morto dopo un mese con neoproduzioni nel grande epiploon e nel fegato sotto la stessa forma di quelle del coniglio precedente, con glandole linfatiche addominali ingrossate. Nulla di notevole vi era nella milza e nei reni. Nei polmoni vi erano lesioni più estese che non nel coniglio precedente. Le colture fatte dalla milza sono rimaste sterili. Le neoproduzioni delle glandole linfatiche e del fegato sono identiche a quelle del coniglio precedente. Le lesioni più importanti sono quelle dei polmoni e consistono nella epatizzazione completa di alcuni lobi dovuta alla proliferazione delle cellule neoformate e alla proliferazione dell'epitelio bronchiale e delle cellule alveolari (fig. 4-5-6, tav. IV; fig. 1-3, tav. IX). Nelle sezioni dei vasi sanguigni spesso si vedono gruppi di cellule neoplastiche.

Nel terzo coniglio, morto in seguito ad inoculazione nello addome di prodotti ricavati da una coltura su patata dello stesso blostomicete patogeno dopo 4 mesi e 20 giorni si sono riscontrate lesioni solamente nello epiploon, nel fegato e nei polmoni, identiche a quelle innanzi descritte.

Il quarto coniglio inoculato in addome coi prodotti del *Saccharomyces canis II* è morto dopo 34 giorni, ed ha presentato un reperto anatomo-patologico molto interessante. Tutto il grande omento era trasformato in in una massa neoplastica che ricopriva buona parte delle anse intestinali. Sulla superficie superiore del fegato vi erano numerose placche, di colorito bianco-gialliccio, ovoidali e rotonde, alquanto sporgenti. Nel parenchima epatico vi erano noduli disseminati della grandezza di testa di spillo. La milza si presentava molto più grossa del normale. I reni erano normali. Le glandole linfatiche addominali erano molto ingrossate. Nei polmoni vi erano noduli superficiali sottopleurali e profondi.

Istologicamente le lesioni erano identiche a quelle osservate negli altri conigli. Nel fegato, oltre le lesioni nodulari, vi era una grande disseminazione di cellule giganti nel resto del parenchima, più numerose in vicinanza dei vasi sanguigni e biliari. Parecchie cellule giganti si vedevano anche nelle sezioni dei vasi sanguigni. Nella milza, specialmenta nei follicoli, vi erano numerose chiazze di cellule neoformate simili a quelle riscontrate nelle altre lesioni con qualche cellula gigante. Le stesse neoformazioni si riscontravano nelle glandole linfatiche addominali. Come negli altri conigli, le colture fatte dagli organi diedero risultato negativo.

Reperti presso a poco identici hanno presentato gli altri due conigli inoculati in addome con prodotti del blastomicete del Plimmer e morti dopo 63 ed 87 giorni.

In conclusione, *con la inoculazione dei soli prodotti solubili dei blastomiceti nell'addome dei conigli si sono prodotte lesioni più estese e più importanti che non con la inoculazione dei soli parassiti.* È inoltre da notare che mentre con la inoculazione addominale dei soli parassiti la maggior parte degli animali non muore, con la inoculazione dei soli prodotti si ha costantemente la morte dei conigli.

Furono tre i *conigli inoculati nell'addome con prodotti e parassiti vivi* (*Saccharomyces canis II*).

Il primo è morto dopo 4 mesi con lesioni nel grande epiploon, nel fegato e nei polmoni, identiche a quelle innanzi descritte. Nelle glandole linfatiche addominali vi erano, specialmente verso la parte corticale, numerose chiazze di cellule neoformate, contenenti gli stessi granuli bruno-giallicci, che si riscontravano nelle cellule della lesione primitiva (fig. 2, tav. VIII).

Il secondo coniglio è morto dopo 27 giorni con lesioni nel grande omento, nelle glandole linfatiche, nel fegato e nei polmoni, identiche a quelle descritte. Nella milza e nei reni nulla si è osservato di anormale. Sulla superficie dell'intestino tenue e del crasso vi sono numerose chiazze di un tessuto bianco-gialliccio, alquanto sollevate. Tra le anse intestinali non vi sono aderenze. La sierosa peritoneale è liscia e lucente. Sulla superficie superiore del fegato si notano le stesse placche che si vedono sulla superficie dello intestino. Sulla faccia inferiore del diaframma vi sono le stesse neoproduzioni.

Nel terzo coniglio, morto dopo 43 giorni, si sono riscontrate lesioni identiche a quelle del primo.

Riferirò ora il reperto di uno dei *conigli inoculati in addome con soli parassiti senza prodotti*, il solo risultato positivo sopra tre negativi.

E' stata inoculata un po' della patina del *Saccharomyces canis II* emulsionata in acqua sterile. L'animale è morto dopo 34 giorni in preda a fortissimo dimagramento. Alla sezione si trovò la superficie superiore ed inferiore del fegato cosparsa di neoformazioni di colorito bianco-gialliccio di varia grandezza. Lesioni identiche ugualmente numerose si trovavano sulla faccia inferiore del diaframma. Parecchi noduli si vedevano nella sostanza corticale dei reni. La milza appariva normale. Le glandole linfatiche addominali erano ingrossate. Nel grande epiploon vi erano qua e là sparse le stesse neoformazioni che esistevano sulla superficie del fegato. Le lesioni polmonali consistevano in una epatizzazione più o meno completa di alcuni lobi.

Le neoformazioni del grande omento (fig. 2, tav. IX) vedute al microscopio fanno vedere una struttura lobare. Ciascun lobo è costituito da più cellule a nucleo vescicolare ed a corpo protoplasmatico ampio, sovrapposte in più strati e sostenute da sostanza connettiva leggiermente infiltrata. Il

connettivo che sostiene i lobi parte dallo involucro connettivale che tutti li circonda.

Le neoformazioni esistenti sulla superficie del fegato (fig. 3, tav. X) sono costituite dallo stesso tipo di cellule con scarse cellule giganti, circondate da tessuto connettivo, che le separa dal parenchima epatico. Al centro di alcune di queste neoformazioni si osserva detritus nucleare con forme parassitarie. Alcune di queste si riscontrano nei corpi cellulari. Nel parenchima epatico non vi sono alterazioni. Le neoformazioni esistenti nella sostanza corticale dei reni presentano la stessa struttura delle lesioni riscontrate nel fegato. Lo stesso deve dirsi delle lesioni esistenti sulla superficie inferiore del diaframma. Nei polmoni la epatizzazione è dovuta alle stesse cellule che costituiscono le lesioni addominali. In questo tessuto neoformato dei polmoni si osserva considerevole proliferazione dell'epitelio bronchiale e di quello alveolare. Nei polmoni non si riscontrano parassiti. E' quindi probabile che le alterazioni non sieno dovute ad emigrazione di parassiti, ma di cellule neoformate delle lesioni addominali.

Dei due conigli inoculati in vena con parassiti e prodotti del *Saccharomyces canis II*, il primo è morto dopo 24 giorni ed il secondo dopo 23. Alla sezione si sono riscontrate ingrossate le glandole sottocutanee inguinali ed ascellari; ingrossate sono pure le glandole linfatiche addominali. Il fegato e la milza sono ingrossati, ma non mostrano lesioni. Nei reni ad occhio nudo non si vedono lesioni. Nei polmoni vi sono piccoli noduli sottopleurali.

Con l'esame microscopico si riscontrano lesioni in tutti gli organi. Nelle glandole linfatiche sottocutanee vi sono chiazze di cellule grandi con nucleo vescicolare, simili a quelle costituenti le lesioni negli altri conigli. Le stesse cellule infiltrano il tessuto cellulo-adiposo, che circonda le glandole linfatiche (fig. 2, tav. X). Le stesse lesioni si osservano nelle glandole linfatiche addominali e nella milza. Nella milza tra le maglie del reticolo si vedono numerose cellule giganti. Queste sono in abbondanza disseminate nel parenchima epatico. Parecchi nuclei delle cellule epatiche mostrano figure cariocinetiche. Le cellule giganti non sembrano essere dovute alle cellule epatiche. Nei reni tanto nella sostanza corticale, quanto in quella midollare vi sono neoformazioni costituite dalle stesse cellule di natura endoteliale, infiltrantisi tra i canalini uriniferi. Nel midollo delle ossa lunghe anche vi sono di queste neoformazioni. Le lesioni dei polmoni consistono in gruppi più o meno estesi di cellule neoformate sottopleurali ovvero nelle pareti connettivali dei vasi (fig. 1, tav. X). Ciò che vi è di notevole in questi reperti istologici è la estrema scarsezza dei parassiti. Le lesioni devono essere attribuite in massima parte ai prodotti.

VI.

Esperimenti sulle cavie. — Sapendo che nelle cavie la inoculazione dei blastomiceti dà luogo ad una infezione diffusa con moltiplicazione abbondante dei parassiti e scarsa reazione da parte degli elementi cellulari, era interessante studiare l'azione che produce

in questi animali la inoculazione dei soli prodotti solubili. A questo scopo si sono inoculati soli prodotti nel connettivo sottocutaneo e nella cavità addominale.

Furono tre le *cavie inoculate nel connettivo sottocutaneo con i prodotti solubili* ricavati da una coltura su patate di *Saccharomyces canis II* conservata per 3 mesi nel termostato in tubo chiuso alla fiamma. Sono morte dopo 29, 30, 34 giorni ed hanno presentato lo stesso reperto anatomo-patologico ed istologico. Al sito d'inoculazione si è riscontrata una neoproduzione grande come nocciuola, di colorito bianco-giallicoio, della consistenza della carne di pesce. Le glandole linfatiche in vicinanza del sito di inoculazione apparivano ingrossate. Nella cavità addominale si riscontravano ingrossate le glandole linfatiche, i reni con chiazze giallastre alla superficie, la milza ed il fegato normali. Nei polmoni vi erano neoproduzioni nodulari sottopleurali ed epatizzazione a chiazze nel parenchima.

Le colture fatte dagli organi di queste cavie sono rimaste sterili, come in quasi tutti gli animali inoculati con prodotti. Se qualche volta si è avuto sviluppo di germi patogeni, non si sono utilizzati gli organi per la ricerca istologica.

La neoproduzione nel sito d'inoculazione è costituita da elementi cellulari simili a quelli riscontrati nei conigli, disposti a zolle, separate da tessuto connettivo. Qua e là vi sono cellule giganti. Le glandole linfatiche in vicinanza del sito d'inoculazione fanno vedere alla periferia zone costituite dalle stesse cellule. Lo stesso si osserva nelle glandole linfatiche addominali. Nella milza e nel fegato non si osserva nulla di anormale. Nella sostanza corticale dei reni vi sono neoformazioni costituite dalle stesse cellule ed in vicinanza di queste si vedono molte sezioni di canali uriniferi neoformati con epitelio giovane, meno alto dell'epitelio che riveste i canali uriniferi normali. Le neoproduzioni dei polmoni presentano gli stessi caratteri istologici e si trovano ordinariamente in rapporto con le pareti dei vasi e con quelle bronchiali. In vicinanza si vedono proliferazioni bronchiali.

Appare chiara la differenza fra questo reperto e quello delle cavie inoculate sottocutaneamente con i soli parassiti. In queste ultime si hanno neoproduzioni nel sito d'inoculazione ed in tutti gli organi, ma queste sono costituite dai parassiti moltiplicatisi abbondantemente nell'organismo. Invece *nelle cavie inoculate coi prodotti si hanno neoformazioni costituite da elementi cellulari.*

Furono due le *cavie inoculate nell'addome coi prodotti dello stesso Saccharomyces canis II*. La prima è morta dopo 29 giorni, la seconda dopo 56. In tutte e due queste cavie si sono trovate neoproduzioni nel grande omento, di varia grandezza, glandole linfatiche alquanto ingrossate, reni con le stesse lesioni osservate nelle cavie precedenti, fegato e milza normali. Nei polmoni vi erano le stesse lesioni descritte innanzi. Le cellule costituenti le neoproduzioni del grande epiploon erano disposte in gruppi più o meno estesi tra le maglie di un tessuto connettivo lasco (fig. 1, tavola VII). Le cellule giganti non erano molto numerose. In alcune sezioni

di queste neoproduzioni si osserva la tendenza degli elementi cellulari alla formazione di piccole cisti con pareti costituite da cellule ad uno o due strati e contenuto omogeneo (fig. 3, tav. VII). Nei reni e nei polmoni si vedono le stesse lesioni istologiche osservate nelle cavie inoculate sottocutaneamente.

Nelle glandole linfatiche addominali, specialmente al di sotto della capsula connettivale, si osservano estese chiazze di cellule simili nella forma e nella disposizione a quelle che costituiscono le lesioni primitive del grande omento (fig. 2, tav. VII).

VII.

Conclusioni. — Da tutti gli esperimenti su riferiti si possono dedurre le conclusioni seguenti:

1° Le cellule dell'organismo reagiscono all'azione dei prodotti solubili dei blastomiceti moltiplicandosi con alterazione della forma e della funzione (anaplasia) e producendo localmente un tessuto neoplastico, dal quale possono distaccarsi particelle, che, trasportate dalla corrente linfatica o sanguigna, vanno a fermarsi a distanza negli organi, generando ivi nuovo tessuto, per struttura simile a quello onde esse provenivano.

2° Siccome il fatto cui innanzi si è accennato costituisce il carattere fondamentale che differenzia i tumori maligni dai tumori d'infiammazione cronica, le lesioni prodotte dai blastomiceti devono essere classificate fra le vere neoplasie.

Messina, agosto 1906.

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE (1).

Tavola I.

Fig. 1. — Sarcoma del prepuzio sviluppatosi in un cane in seguito alla inoculazione nel connettivo sottocutaneo in vicinanza del pene dei prodotti ricavati da una coltura su patata di *Saccharomyces canis II.* Il tumore è stato fotografato a grandezza naturale. L'animale è morto 15 settimane dopo l'inoculazione.

Fig. 2. — Tumore del grande epiploon, tagliato per metà, sviluppato in un cane in seguito alla inoculazione nella cavità addominale dei prodotti ricavati da una coltura su patata di *Saccharomyces canis II.* Il tumore è stato fotografato a grandezza naturale. L'animale è morto 15 settimane dopo l'inoculazione.

---

(1) Devo le fotografie dei preparati microscopici alla gentilezza del dottore Schiff Ruggiero.

Fig. 3. — Glandole linfatiche addominali molto ingrossate di un gatto morto 41 giorno dopo l'inoculazione nella cavità addominale di prodotti ricavati da una coltura su patata di *Saccharomyces canis II*. Le glandole sono state fotografate a grandezza naturale.

Fig. 4. — Tumore nel grande omento dello stesso gatto.

TAVOLA II.

Fig. 1. — Glandole linfatiche addominali molto ingrossate di un gatto morto 40 giorni dopo l'inoculazione nella cavità addominale di parassiti e prodotti di una coltura su patata di *Saccharomyces canis I*. Le glandole sono state fotografate a grandezza naturale.

Fig. 2. — Neoproduzioni nel mesentere di un gatto morto 41 giorni dopo l'inoculazione nella cavità addominale dei prodotti ricavati da una coltura su patata di *Saccharomyces canis II*. Le neoproduzioni sono state fotografate a grandezza naturale.

Fig. 3. — Tumori nella cavità addominale di un gatto morto 40 giorni dopo l'inoculazione nella cavità addominale di parassiti e prodotti ricavati da una coltura su patata di *Saccharomyces canis I*. I tumori sono stati fotografati a grandezza naturale.

Fig. 4. — Tumore del grande omento di un gatto morto 50 giorni dopo la inoculazione nella cavità addominale di parassiti e prodotti ricavati da una coltura su patata di *Saccharomyces canis I*. Il tumore è stato fotografato a grandezza naturale.

TAVOLA III.

Fig. 1. — Fegato di cane morto 1 mese dopo la inoculazione nella cavità addominale dei prodotti solubili ricavati da una cultura su patata di un blastomicete patogeno isolato da un papilloma infettante dell'ovaio. Sulla superficie superiore del fegato si vedono riproduzioni per disseminazione del tumore primitivo avente sede nel grande epiploon. Il fegato è stato fotografato a grandezza naturale

Fig. 2. — Sezione delle riproduzioni esistenti sulla superficie del fegato del cane precedente. Formazioni cistiche con epitelio stratificato. Oc. 2, Ob. C. Zeiss.

Fig. 3. — Idem. Oc. 2, Ob. A. Zeiss.

Fig. 4. — Metastasi in una glandola retroperitoneale linfatica dello stesso cane. Oc. 2, Ob. C. Zeiss.

Fig. 5. — Idem. Oc. 2 Ob. C. Zeiss.

Fig. 6. — Metastasi nel tessuto cellulo-adiposo del grande epiploon di un cane morto 56 giorni dopo la inoculazione nella cavità addominale di prodotti ricavati da una coltura su patata di *Saccharomyces canis II*. Oc. 2, Ob. C. Zeiss.

TAVOLA IV.

Fig. 1. — Milza di coniglio morto 67 giorni dopo la inoculazione nella cavità addominale di prodotti ricavati da una coltura su patata del blastomicete del Plimmer. Nello interno del follicolo si vedono chiazze di cellule neoformate. Oc. 2, Ob. C. Zeiss.

Fig. 2. — Milza dello stesso coniglio. Numerose cellule giganti nelle maglie del reticolo splenico. Oc. 2, Ob. C. Zeiss.

Fig. 3. — Fegato dello stesso coniglio. Neoformazioni circondate da proliferazioni dei dotti biliari e da numerose cellule giganti. Oc. 2, Ob. C. Zeiss.

Fig. 4. — Polmone di coniglio morto 1 mese dopo la inoculazione nella cavità addominale di prodotti ricavati da una coltura di *Saccharomyces canis I*. Proliferazioni dell'epitelio bronchiale. Oc. 2, Ob. C. Zeiss.

Fig. 5. — Polmone dello stesso coniglio. Idem. Oc. 2, Ob. C. Zeiss.

Fig. 6. — Polmone dello stesso coniglio. Neoproduzione dovuta alla proliferazione delle cellule endoteliali e delle cellule alveolari. Oc 2, Ob. C. Zeiss.

TAVOLA V.

Fig. 1. — Sezione del grande omento infiltrato di cellule neoplastiche del cane morto 1 mese dopo la inoculazione nella cavità addominale di prodotti ricavati da una coltura in patata di un blastomicete isolato da un papilloma infettante dell'ovaio. Oc. 4, Ob. S. Koristka.

Fig. 2. — Una parte periferica della stessa sezione veduta a forte ingrandimento. Oc. 4, Ob. 1-12 im. Koristka.

Fig. 3. — Epitelio peritoneale della superficie superiore del fegato in corrispondenza delle neoproduzioni dello stesso cane. Oc. 4, Ob. 1-12 im. Koristka.

Fig, 4. — Sezione di una formazione cistica nel tumore del grande omento dello stesso cane. Oc. 4, Ob. 5. Koristka.

TAVOLA VI.

Fig. 1. — Sezione di rene di cane morto 56 giorni dopo la inoculazione nella cavità addominale di prodotti ricavati da una coltura su patata di *Saccharomyces canis II*. Proliferazione dei tubuli uriniferi in vicinanza delle metastasi. Oc. 4, Ob. 5. Koristka.

Fig. 2. — Nodulo neoplastico nell'omento di un cane morto 30 giorni dopo la inoculazione endovenosa di parassiti e prodotti ricavati da una coltura di *Saccharomyces canis II*. Oc. 4, Ob. 5. Koristka.

Fig. 3. — Nodulo neoplastico del pancreas di un cane morto 42 giorni dopo la inoculazione endovenosa di parassiti e prodotti ricavati da una coltura di *Saccharomyces canis II*. Oc. 4, Ob. 5. Koristka.

Fig. 4. — Sezione del tumore di un gatto morto 50 giorni dopo la inoculazione nella cavità addominale di prodotti e parassiti provenienti da una coltura su patate di *Saccharomyces canis I*. L'epitelio della sierosa in contatto del tumore è diventato cubico. Oc, 4, Ob. 5. Koristka.

Fig. 5. — Neoformazione nel polmone di un gatto morto dopo 88 giorni dalla inoculazione endotracheale di parassiti e prodotti ricavati da una coltura su patata di *Saccharomyces canis II*. Neoformazione dovuta alle cellule endoteliali ed alle cellule alveolari Oc. 4, Ob. 5. Koristka.

TAVOLA VII.

Fig. 1. — Neoproduzione del grande epiploon di una cavia morta 29 giorni dopo la inoculazione nella cavità addominale dei prodotti ricavati da una coltura su patata di *Saccharomyces canis II*. Oc. 4, Ob. 5. Koristka.

Fig. 2. — Neoproduzione nelle glandole linfatiche addominali della stessa cavia. Oc, 4, Ob. 5. Koristka.

Fig. 3. — Neoproduzione del grande epiploon di una cavia morta 56 giorni dopo la inoculazione nella cavità addominale dei prodotti ricavati da una coltura su patata di *Saccharomyces canis* . Oc. 4*II*, Ob. 5. Koristka.

Fig. 4. — Neoproduzione nel fegato di un coniglio morto 69 giorni dopo la inoculazione nella cavità addominale dei prodotti ricavati da una coltura su patata del blastomicete del Plimmer. La neoformazione è ricca di cellule giganti, di cui alcune di origine epatica. Intorno alla neoformazione vi è ricca produzione di dotti biliari. Oc. 4, Ob. 5. Koristka.

TAVOLA VIII.

Fig. 1. — Sezione di fegato di coniglio morto dopo 80 giorni dalla inoculaziono sottocutanea dei prodotti ricavati da una coltura su patata di *Saccharomyces canis I*. Cellule neoplastiche contenenti granuli di pigmento in vicinanza di vasi sanguigni. Oc. 4, Ob. 5. Koristka.

Fig. 2. — Sezione di glandola linfatica addominale di un coniglio morto 4 mesi dopo la inoculazione nella cavità addominale di parassiti e prodotti ricavati da una coltura su patata di *Saccharomyces canis II*. In vicinanza della capsula si vedono cellule neoformate contenenti gli stessi granuli di pigmento che si osservano nella lesione primitiva. Oc. 4, Ob. 5. Koristka.

Fig. 3. — Sezione di milza di coniglio morto 69 giorni dopo la inoculazione nella cavità addominale di prodotti ricavati da una coltura su patata del blastomicete del Plimmer. Numerose cellule giganti nel follicolo e nelle maglie del reticolo. Oc. 4, Ob. 5. Koristka

TAVOLA IX.

Fig. 1. — Sezione di polmone di coniglio morto 1 mese dopo la inoculazione nella cavità addominale di prodotti ricavati da una coltura su patata di *Saccharomyces canis I*. La neoformazione è dovuta alla proliferazione delle cellule endoteliali ed alveolari. Oc. 4, Ob. 5 Koristka.

Fig. 2. — Sezione del tumore del grande omento di un coniglio morto 34 giorni dopo la inoculazione nella cavità addominale di soli parassiti (*Saccharomyces canis II*). Oc. 4, Ob. 5. Koristka.

Fig. 3. — Sezione di polmone di coniglio morto 1 mese dopo la inoculazione nella cavità addominale di prodotti ricavati da una coltura su patata di *Saccharomyces canis I*. La neoformazione è dovuta alla proliferazione delle cellule endoteliali e dell'epitelio bronchiale. Oc. 4, Ob. 5. Koristka.

TAVOLA X.

Fig. 1. — Sezione di polmone di coniglio morto 24 giorni dopo la inoculazione endovenosa di parassiti e prodotti ricavati da una coltura su patata di *Saccharomyces canis II*. Neoformazione in rapporto con l'avventizia di una vena. Oc. 4, Ob. 5. Koristka.

Fig. 2. — Neoformazione nel connettivo cellulo-adiposo in vicinanza di una glandola linfatica inguinale dello stesso coniglio. Oc. 4. Ob. 5. Koristka.

Fig. 3. — Neoformazione sulla superficie del fegato di un coniglio morto 34 giorni dopo la inoculazione nella cavità addominale di soli parassiti (*Saccharomyces canis II*). Oc. 4, Ob. 5. Koristka.





Fig. 1.



Fig. 2.







Istituto d'Igiene della R. Università di Padova
diretto dal prof. A. Serafini.

Influenza del lavoro mentale esagerato sul numero, sul contenuto emoglobinico e sulla resistenza dei globuli rossi del sangue.

Per il dott. **ALBERTO GRAZIANI**, aiuto.

Fra le malattie, che vengono ragruppate oggidì sotto il nome di malattie della scuola, si presenta del massimo interesse una forma di anemia, *anemia degli studiosi*, che le statistiche dimostrano essere in diretto rapporto con le occupazioni scolastiche.

Il dottor Karl Schmid-Monnard in una serie di ricerche sulle malattie della scuola, trovò che nelle scuole femminili le ragazze inscritte al 1° anno, in principio del corso sono anemiche nella proporzione del 12 %. mentre alla fine dello stesso anno la proporzione delle anemiche è di 24 %; lo stesso rapporto esiste nelle altre classi inferiori, mentre nelle superiori l'anemia aumenta, colpendo un terzo od anche la metà di tutte le scolare. Nelle scuole maschili si trova pure l'anemia più frequente nelle classi superiori in confronto alle inferiori, però in proporzioni sempre minori che nelle classi femminili.

La vita sedentaria, in ambienti chiusi e mal aereati, la necessaria trascuranza di molti precetti igienici, vennero invocati a spiegare l'insorgere e il permanere di un tale stato anormale; essi però non si mostrarono sufficienti a giustificarlo completamente, così che sulla sua origine sorsero naturalmente altre diverse ipotesi.

Già dal 1896 il Serafini ha dimostrato come durante il periodo che precede gli esami, gli studenti universitari introducano una

quantità di cibo inferiore a quella che assumono in altre epoche e che sarebbe necessaria per l'equilibrio del ricambio, affermando che « la deficiente ingestione di cibo raggiunge durante il periodo degli esami proporzioni notevoli, specialmente per particolari condizioni del sistema nervoso, e che essa non è in dipendenza del depresso consumo di sostanza e di forza del corpo, ma di disturbi di natura anestesica nella sfera funzionale nervosa, come in molti nevropatici si avvera ».

A questa deficiente ingestione di cibo, e a questo stato non normale del sistema nervoso è naturale succeda una diminuzione del peso del corpo durante il periodo degli esami.

Infatti, posteriormente agli studi di Serafini, Ignatieff trova diminuito il peso del corpo nel 79 % degli scolari, riscontrando la maggior perdita di peso negli alunni delle scuole superiori in quanto che per questi è più lungo il tempo di preparazione agli esami. Kosinzoff trova pure diminuito il peso dopo gli esami nel 75 % degli scolari, ed afferma che non si ha diminuzione ma talvolta anche un leggero aumento in quelli alunni che per negligenza o per felice temperamento poco si preoccupano dell'esame.

Egli pure trova che la maggior diminuzione di peso si verifica nelle classi superiori e crede che ciò debba riferirsi al fatto che gli alunni di queste prendono gli esami più seriamente di quelli delle classi inferiori; causa di tale diminuzione di peso ritiene sia la grande irritazione nervosa cui i ragazzi sono sottoposti a causa dell'esame, che ruba loro il sonno e l'appetito.

È naturale che questo squilibrio fra l'entrata e l'uscita, che si rende manifesto in modo così evidente con la diminuzione del peso di tutto il corpo, abbia a portare delle alterazioni anche sui componenti di questo e specialmente sulla crasi sanguigna.

Però le ricerche non si limitarono a questo punto, ma si spinsero fino a studiare se il lavoro mentale potesse esercitare sulla crasi sanguigna una influenza più diretta.

Già il Mosso aveva dimostrato che durante la tranquillità della mente la profondità dei movimenti respiratori si fa maggiore e la respirazione diaframmatica più forte, mentre quando si fa lavorare il cervello la respirazione si modifica e prevalgono i movimenti del torace sui movimenti del diaframma. Il Macdonald studiando le cause della anemia degli scolari la pone in relazione con le modificazioni della respirazione sotto l'influenza diretta del sistema nervoso.

Egli potè dimostrare che durante il lavoro cerebrale nei fanciulli,

la respirazione si fa meno profonda e che la diminuita ossigenazione del sangue è in relazione diretta con la difficoltà del lavoro mentale. Il Binet giunse a conclusioni simili trovando che una breve attività mentale forzata come il contare, provoca un aumento della frequenza respiratoria, con respiro superficiale a corte pause, e che appena finito il lavoro mentale si ha una profonda ispirazione dopo la quale si ripristina il ritmo normale.

Obici nel 1903 con una lunga serie di ricerche viene a concludere che ai momenti di assoluto e relativo riposo mentale, corrisponde un aumento della profondità del respiro, mentre ai periodi di attività mentale corrispondono respirazioni tanto più superficiali quanto più intenso è il lavoro cerebrale compiuto, fino ad aversi a volte una pausa più o meno lunga, quando si compiono atti di appercezione o sforzi di memoria. « La stanchezza mentale accompagnandosi ad una diminuzione della frequenza respiratoria e ad una grande irregolarità e diminuzione complessiva nella ampiezza delle escursioni toraciche, si accompagna forse ad una minore ventilazione polmonare e perciò ad un assorbimento incompleto da parte del sangue di ossigeno e ad una deficiente eliminazione dell'acido carbonico ».

Anche il Badaloni, pur prescindendo dalla influenza diretta del sistema nervoso sulla respirazione, recentemente dimostrò che per le posizioni viziate che assumono gli scolari durante la lettura o la scrittura si ha una limitazione dei movimenti di almeno una parte del torace, per cui ne risulta una respirazione superficialissima del lato compresso ed immobilizzato.

Da tutte queste ricerche, mentre da una parte viene ad essere sempre maggiormente giustificata la classificazione di una forma di anemia tra le malattie degli studiosi, nuova luce viene a illuminare le cause che valgono a determinarla.

Però le grandi analogie che si sono trovate ed illustrate tra il lavoro mentale e le altre funzioni fisiologiche dell'organismo, per cui quello e queste si devono ritenere soggetti alle stesse leggi, devono necessariamente spostare il campo delle indagini e condurre a ricercare altre cause di questa forma di anemia oltre a quelle finora conosciute ed indiscutibili.

È ben noto il fatto conosciuto per osservazione comune e scientificamente studiato dal Mosso, come si ricordino male e a stento le impressioni che arrivano al cervello quando il corpo è esaurito da una lunga fatica muscolare, quando cioè i prodotti di rifiuto provenienti dal lavoro dei muscoli hanno invaso tutto l'organismo.

determinando nei diversi organi e quindi anche nel cervello variati effetti della loro azione tossica. D'altra parte quando la mente ha lavorato intensamente non è stanco soltanto il sistema nervoso centrale, ma se ne risentono anche i nervi ed i muscoli, per cui secondo le esperienze del Mosso, si riscontrano grandi differenze misurando la forza muscolare prima e dopo un intenso lavoro intellettuale; è logico supporre che tali alterazioni della forza muscolare sieno dovute ai prodotti tossici provenienti dal lavoro del cervello.

Il Peter in una sua lezione clinica tenuta nel 1878, affermava che « allorquando facciamo muovere i nostri muscoli noi produciamo della creatina e della creatinina, ed il cervello che lavora produce della leucina e della colesterina. Questi diversi elementi di disassimilazione, come molti altri, sono destinati a scomparire prontamente dall'economia, ma non tarderanno ad alterare il sangue, quando sotto l'influenza di un lavoro intellettuale o muscolare esagerato si saranno prodotti in troppo grande quantità per poter essere eliminati dagli emuntori naturali ».

Che tale alterazione del sangue avvenga in seguito a lavoro muscolare esagerato lo dimostra l'emoglobinuria che spesso si avvera in seguito a grandi fatiche. Fu appunto questo fatto che indusse il Manca a studiare la influenza della fatica muscolare sulla resistenza dei globuli rossi. Dalle sue ricerche questo autore viene a concludere che la resistenza delle emazie è leggermente aumentata dopo il lavoro muscolare; l'aumento non è però eguale e costante verso tutte le soluzioni saline adoperate; mai però trovò alcun accenno a diminuzione di resistenza.

Parvemi quindi opportuno, poichè alcuno studio non esiste in questo senso, ricercare se un fatto analogo si avesse a verificare in seguito al lavoro cerebrale e cioè se un esagerato lavoro del cervello possa produrre delle alterazioni sul numero, composizione, proprietà degli elementi figurati del sangue e precisamente dei più importanti fra essi ossia dei globuli rossi. Tale appunto è lo scopo delle seguenti ricerche.

***

Per procedere con sicurezza allo studio dell'influenza del lavoro mentale esagerato sul numero, contenuto emoglobinico, e resistenza delle emazie, è necessario tener presente quali altre cause possono influire su di essi, per evitare di attribuire al lavoro mentale conseguenze dovute invece ad altri fattori concomitanti. Riguardo al

numero delle emazie è noto che esso diminuisce nella stagione estiva, per il soggiorno nelle città, nei luoghi male areati e dove si diffondono gas nocivi, mentre aumenta per il soggiorno sulle montagne a grandi altezze. Il contenuto emoglobinico può subire pure delle variazioni; aumenta relativamente per la sottrazione delle bevande, per i copiosi sudori, per il digiuno; diminuisce per le sottrazioni sanguigne e in proporzione delle medesime. Assai meno note sono le variazioni della isotonia delle emazie in relazione con i diversi stati fisiologici dell'organismo.

Nel 1892 il Gallerani studia la resistenza delle emazie nel digiuno, più tardi il Lesage ricerca se esiste differenza tra la resistenza dei globuli durante il digiuno e durante il periodo della digestione, Viola studia l'ematopoiesi da allattamento e l'aumento della resistenza media, Jona, Zanier, Hubbels la resistenza nei neonati, Obici la resistenza globulare nei vecchi alienati e normali, Molon e Gasparini ancora la influenza del digiuno.

Chiunque del resto abbia un po' di pratica in questo genere di ricerche, conosce benissimo le difficoltà che in esse si riscontrano e come non sia il caso di basarsi sopra risultati singoli in quanto che molto grandi sono le variabilità che si incontrano, tali da condurre a conclusioni talvolta contraddittorie. Perciò in questo genere di studi, credo sia opportuno, come venne da me praticato, eseguire le esperienze su abbondante materiale, e non tener conto che dei dati che si presentano identici con la massima costanza.

È necessario inoltre che l'osservatore sia sempre il medesimo, in quanto che certi apprezzamenti di natura soggettiva, come quelli colorimetrici, non sarebbero altrimenti confrontabili fra loro. Ciò premesso passo alla tecnica da me seguita nelle mie ricerche.

Per la determinazione del numero delle emazie mi servii del contaglobuli di Thomas-Zeiss, facendo la numerazione subito dopo l'estrazione e la diluizione del sangue, e per la valutazione dell'emoglobina adoperai l'emometro di Fleischl.

La resistenza dei globuli rossi venne da me studiata secondo il metodo seguito dal Viola, metodo che è ormai di uso comune e per la descrizione del quale rimando all'ampio lavoro del predetto autore. Le soluzioni saline vennero preparate con le precauzioni che si usano per le soluzioni titolate, e in quantità tale da essere sufficienti per tutto il corso delle esperienze. Per assicurarmi che tali soluzioni non si alteravano facevo di tempo in tempo in esse il dosaggio del cloruro di sodio, con uno dei metodi che si seguono per l'analisi quantitativa dei cloruri nelle acque. Invece di servirmi però del costoso dispositivo di Viola, posi le 24 bottiglie contenenti le diverse soluzioni schierate in tre file sopra una mensola. Queste bottiglie vennero chiuse con un tappo a due fori, uno dei quali

dà passaggio ad un breve tubicino di vetro chiuso da un tappo di cotone in modo da permettere l'entrata dell'aria; per il secondo foro del tappo passa un secondo tubo di vetro che mentre arriva con una estremità fino al fondo della bottiglia, è piegato ad angolo retto appena sopra il tappo e venendo poscia a sporgere sul davanti della fila anteriore di bottiglie, viene a subire una nuova ripiegatura pure ad angolo retto, e si prolunga in basso fino ad oltrepassare il fondo delle bottiglie. A questa estremità è innestato un tubo di gomma chiuso da una pinzetta a pressione, il quale all'altra estremità porta un piccolo tubicino di vetro affilato a punta. Una volta aspirato il liquido interno si forma sifone attraverso a questo tubo e con un po' di pratica si riesce a farne penetrare rapidamente l'estremità affilata nelle provettine che un apposito supporto mantiene schierate alla debita distanza e numerate. Aprendo la pinza a pressione con facilità e sollecitudine la soluzione passa nelle provette nella quantità che si desidera. Le provette da me usate sono più piccole e di minore diametro di quelle usate dal Viola, in modo che la quantità di soluzione adoperata pur essendo soltanto di quattro cmc. forma una colonna di liquido alta circa 6 cm. Ho limitato così la quantità di soluzione salina da usarsi per poter adoperare una minore quantità di sangue e risparmiarmi l'operazione non facile nè in tutti i soggetti applicabile dell'estrazione del sangue da una vena del braccio. Feci fare invece delle piccole lancette taglientissime di 2 mm. di larghezza con le quali pungevo il polpastrello di un dito delle mani, ottenendone una quantità di sangue sufficiente per tutte le ricerche; questo sangue veniva distribuito nelle 24 provette presso a poco nella medesima quantità mediante bastoncini di vetro che cambiavo di volta in volta. In tutto il corso delle mie esperienze mai ebbi a lamentare per l'uso di tali lancette inconveniente alcuno ed il dolore provocato dal loro uso uguaglia appena quello dovuto alla puntura di un ago comune.

Nel fare le mie ricerche sopra le modificazioni che può subire il sangue in seguito ad esagerato lavoro mentale credetti opportuno esperimentare sopra due categorie di studiosi, assai diverse per età e per genere di studi e cioè studenti universitari e bambini di IV e V classe elementare. L'osservazione del sangue venne da me fatta una prima volta in tutti almeno un mese e mezzo prima degli esami, in un tempo cioè in cui la preparazione a questi non era cominciata, o al più consisteva in un lavoro mentale normale, nè aveva quindi ancora raggiunto il grado di strapazzo cerebrale, che tocca il suo massimo nei giorni immediatamente precedenti agli esami. L'osservazione di confronto venne eseguita in genere qualche giorno prima degli esami in modo da evitare che il soggetto si trovasse nello stato di eccitamento nervoso proprio dell'ultimo periodo. Ambedue questi saggi furono fatti sempre di mattina, presso a poco alla medesima ora, così da mantenere sempre i medesimi rapporti riguardo al riposo e alla assunzione del cibo.

Di 18 studenti universitari e di 17 bambini di IV e V classe che si prestarono per il primo saggio, potei utilizzare per il secondo soltanto 10 studenti e 12 bambini, gli altri o si erano ritirati dagli esami o non risposero all'invito. Nella tabella I espongo i risultati che si riferiscono agli studenti universitari. È notevole intanto la costante e grande diminuzione di peso subìta da tutti i soggetti, diminuzione che varia da 2 a 5 kg. con una media da 4. 9 kg. % del peso corporeo.

TABELLA I. *Ricerche eseguite sopra studenti universitari.*

Nome	Età — Anni	Genere di studio	Prima del lavoro mentale						Dopo il lavoro mentale					
			Peso in kg.	Numero delle emazie	Contenuto emoglobinico	Resistenza R. 1	Resistenza R. 2	Resistenza R. 3	Peso in kg.	Numero delle emazie	Contenuto emoglobinico	Resistenza R. 1	Resistenza R. 2	Resistenza R. 3
P. F.	25	Laureando in medicina	70	6,000,000	75	32	40	50	68	5,200,000	70	32	38	46
S. A.	22	IV anno di medicina	70.600	5,300,000	95	32	40	48	60	4,800,000	80	34	38	46
T. A.	23	Id.	62.700	5,200,000	82	30	38	48	58.800	4,750,000	60	30	40	46
T. G.	26	Laureando in medicina	66.300	4,000,000	90	32	38	48	63	4,500,000	85	28	34	46
R. A.	24	IV anno di medicina	60.800	6,000,000	80	30	38	48	58.300	5,500,000	75	30	38	46
C. G.	23	Id.	70.500	5,450,000	80	32	40	50	68.500	5,500,000	70	32	38	46
F. G.	23	IV anno di ingegneria	60	6,000,000	80	34	38	50	56.400	5,300,000	78	34	38	48
F. G.	24	IV anno di medicina	66	5,020,000	88	32	38	48	61	4,800,000	78	32	38	46
G. E.	21	II anno di matematica	60.100	5,300,000	84	32	36	46	58.200	5,400,000	78	34	36	46
O. G.	22	III anno di legge	58.100	4,800,000	80	32	38	48	54.900	4,800,000	75	32	38	46

Relativamente al numero dei globuli rossi invece i risultati non sono concordi, in qualche caso questo è diminuito, in qualche altro è aumentato, nè è possibile trarre qualche conclusione relativamente al significato di simili variazioni. D'altra parte il metodo di Thomas Zeiss come tutti gli altri usati allo stesso scopo, non possono pretendere di dare dei risultati esattissimi, sicchè le differenze non molto notevoli sfuggono alla indagine eseguita col loro mezzo.

Evidente al contrario è la diminuzione del contenuto emoglobinico che si presenta in tutti i soggetti, con una media di circa 10 %; essendo state queste ricerche eseguite sempre da uno stesso osservatore si può ritenere eliminata qualsiasi causa di errore. Veniamo finalmente alla osservazione dei dati relativi alla resistenza dei globuli rossi. Le due resistenze massima R_1 e media R_2 presentano fra i due saggi, qualche modificazione ora in un senso ora nell'altro, sicchè conviene ritenere che tali variazioni sieno indipendenti da una causa costante. Notevole invece perchè si verifica in tutti i casi, è il risalire della resistenza minima R_3 nella scala delle soluzioni clorosodiche. Di questo aumento della resistenza minima mi sforzerò di ricercare le cause dopo aver esposto i risultati ottenuti nelle ulteriori esperienze.

Osservando la tabella II che si riferisce alle ricerche eseguite sopra bambini di IV e V elementare si rileva come l'unica differenza notevole e costante tra il primo ed il secondo saggio riguarda il contenuto emoglobinico che è quasi sempre diminuito con una media di 7.4 %. Il peso corporeo è talora leggermente diminuito, tal'altra leggermente aumentato. Considerando però che i soggetti esaminati si trovavano in via di sviluppo apparisce chiaro che un aumento si sarebbe dovuto verificare in tutti i soggetti. Il numero e la resistenza dei globuli rossi presentano variazioni in più e in meno ora in un senso e ora nell'altro, sicchè non è possibile da essi ricavare un dato costante.

TABELLA II. *Ricerche eseguite sopra ragazzi che dovevano sottoporsi all'esame di maturità.*

Nome	Età — Anni	Genere di studio	Prima del lavoro mentale						Dopo il lavoro mentale					
			Peso in kg.	Numero delle emasie	Contenuto emoglobinico	Resistenza			Peso in kg.	Numero delle emasie	Contenuto emoglobinico	Resistenza		
						R. 1	R. 2	R. 3				R. 1	R. 2	R. 3
S. V.	10	Esame di maturità	34.700	5,330,000	95	30	34	48	34.100	5,300,000	80	30	38	46
F. R.	9	»	25	4,300,000	65	30	36	48	24.300	4,500,000	65	30	36	48
T. A.	10	»	29.500	4,900,000	65	28	34	46	29.200	4,500,000	60	28	34	46
T. G.	13	»	37.200	4,700,000	60	28	34	46	37.700	4,750,000	55	30	36	46
M. C.	12	»	31	3,900,000	60	30	36	46	30.300	4,000,000	60	30	36	46
C. V.	10	»	30	4,200,000	70	32	34	46	30.900	4,200,000	65	30	34	46
G. G.	9	»	24.200	4,400,000	65	30	34	46	24.500	4,300,000	65	30	36	48
R. M.	12	»	45.500	4,100,000	85	30	36	46	45.900	4,200,000	75	30	36	46
B. V.	13	»	43	4,900,000	80	30	36	46	43.900	4,800,000	65	30	34	44
C. E.	10	»	28.700	5,300,000	70	32	36	46	28.300	5,275,000	70	32	36	48
O. G.	12	»	38	4,100,000	75	30	38	48	39	4,000,000	70	30	38	46
D'A. V. ...	13	»	45.700	4,300,000	70	30	36	46	46.500	4,500,000	66	32	36	48

***

Il massimo interesse invece presentano i risultati ottenuti in una terza serie di ricerche eseguite sopra me stesso e sopra un piccolo inserviente di questo Istituto, ragazzo di 12 anni molto intelligente e relativamente istruito.

Per esser certo che le eventuali variazioni che avrei potuto osservare erano da porsi in relazione effettivamente con l'esagerato lavoro mentale e non dipendevano da altre cause, quali il cambiamento di abitudini, di stagione, ecc., che con esso potessero essere concomitanti, parvemi utile e decisivo lo studiare se un intenso lavoro mentale della durata di parecchie ore potesse esercitare una qualche influenza sul numero, sul contenuto emoglobinico e sulla resistenza delle emazie.

Ripetutamente e per parecchie ore mi sottoposi ad un lavoro mentale affaticante e nuovo per me, quale quello di eseguire una lunga serie di calcoli aritmetici, nè tralasciavo di lavorare che quando mi sentivo incapace di proseguire. Così pure al mio piccolo inserviente che lavorava sotto ai miei occhi eseguendo pure calcoli aritmetici, non permettevo di sospendere il lavoro che quando egli stesso mi aveva ripetutamente dichiarato di esser stanco e dal suo contegno mi accorgevo che non avrebbe potuto più continuare.

L'esame del sangue veniva fatto la prima volta immediatamente prima di porsi al lavoro e la seconda appena questo era cessato; nella tavola seguente espongo i risultati che ho ottenuti.

Anche in questo caso (vedi Tavola III) le variazioni del numero dei globuli rossi non hanno alcun significato, mentre notevole invece è la diminuzione del contenuto emoglobinico verificatasi in ogni esperienza sia in me, sia nel piccolo inserviente con una media di 7.5 % per me, di circa 8 % per esso.

Ma le differenze più rilevanti tra i due saggi si riscontrano invece nei dati relativi alla resistenza delle emazie, e precisamente in quelli riguardanti la resistenza minima (R_1). In tutte le esperienze meno in una è notevole il risalire di questa resistenza, la quale in me subisce talora uno spostamento di 2 provette, mentre nel ragazzo esso si limita ad una provetta soltanto.

Terrò conto a suo tempo di questa differenza; parmi però che tale esperienza eliminando qualsiasi altra causa concomitante, permetta di concludere che le variazioni osservate sono in diretto rapporto con lo strapazzo mentale.

TABELLA III. *Ricerche eseguite sopra me stesso.*

Prima del lavoro mentale					Genere di lavoro	Ore di lavoro	Dopo il lavoro mentale				
Numero delle emazie	Contenuto emoglobinico	Resistenza					Numero delle emazie	Contenuto emoglobinico	Resistenza		
		R. 1	R. 2	R. 3					R. 1	R. 2	R. 3
5,050,000	80	30	36	46	Operazioni aritmetiche	4	4,800,000	72	32	38	44
5,200,000	80	30	38	48	»	4 ½	5,000,000	75	32	38	46
4,920,000	75	32	38	48	»	5	4,950,000	70	32	36	42
4,720,000	80	30	38	48	»	6	4,600,000	72	30	36	44
4,800,000	78	32	36	48	»	6	4,850,000	75	32	38	46
5,020,000	80	32	38	48	»	5	5,100,000	73	32	36	46
4,900,000	75	32	36	46	»	5	4,800,000	70	30	34	46
4,900,000	78	30	38	48	»	4 ½	4,950,000	72	32	38	44
Ricerche eseguite sopra un ragazzo di 12 anni.											
5,200,000	75	30	36	48	Operazioni aritmetiche	4	5,000,000	70	32	38	46
4,700,000	80	30	36	46	»	4 ¼	4,500,000	72	32	38	44
4,570,000	70	32	36	48	»	4 ¾	4,500,000	64	30	34	46
4,500,000	70	30	36	48	»	5	4,550,000	62	30	34	46
4,570,000	72	30	36	46	»	6	4,500,000	65	30	36	44
4,600,000	70	30	36	48	»	6	4,650,000	70	30	36	48
4,800,000	72	30	36	46	»	5	4,500,000	65	32	36	46

***

Le mie ricerche mi portano quindi a concludere:

1° In seguito allo strapazzo mentale inerente alla preparazione agli esami, si ha, come già era stato dimostrato da altri autori, nella massima parte dei casi una notevole diminuzione di peso.

2° Il lavoro mentale esagerato conduce ad una diminuzione del contenuto emoglobinico del sangue, mentre nessuna modificazione si riscontra nel numero dei globuli rossi.

3° La resistenza dei globuli rossi in seguito ad un lavoro eccessivo del cervello si modifica; però gli spostamenti che si ottengono non sono comuni a tutte tre le resistenze.

È soltanto la resistenza minima R_3 che risale, mentre la media R_2, e la massima R_1, rimangono si può dire invariate.

Vediamo ora quale significato si può attribuire a questo spostamento della resistenza minima.

Quando, secondo Viola, sui globuli rossi agisce un veleno protoplasmatico a debole concentrazione, questo comincia ad intaccare i globuli di resistenza minima che rappresentano gli individui più vecchi, quelli cioè che si avviano a distruzione. Tutti gli altri globuli rimangono perfettamente intatti e soltanto col crescere della concentrazione del veleno, la sua azione risale ai globuli situati sempre più in alto nella scala delle resistenze, esercitando su di essi un'azione emocatatonistica.

Ora nel risalire isolato della resistenza minima, che nelle mie esperienze si è avverato, si deve vedere non un aumento reale di questa resistenza, bensì un aumento apparente per esagerazione di distruzione globulare.

Tale distruzione consiste nella scomparsa dal circolo dei globuli rossi meno resistenti, dovuta all'intervento di una sostanza ad azione tossica capace di colpire esclusivamente i globuli rossi di minore resistenza, in modo da render questa inferiore al limite minimo fisiologico mantenuto dagli organi emodistruttori, i quali quindi li eliminano rapidamente dal circolo. Allo stato attuale delle nostre conoscenze di fisio-chimica è logico supporre che tale sostanza ad azione tossica, sia il prodotto dell'esagerato lavoro cerebrale, e che per essersi formata in troppa grande quantità non possa venire a tempo eliminata.

Nei bambini che pur dovevano sottoporsi ad un esame relativamente importante, non mi riuscì di dimostrare l'azione di questa sostanza nel sangue; tale risultato negativo concorda del resto con

le osservazioni già citate, per cui la perdita di peso corporeo e la percentuale degli anemici è molto maggiore nelle classi superiori che nelle inferiori. Realmente lo strapazzo mentale nei bambini è meno frequente e meno facile a verificarsi di quanto a prima vista si può credere. Appena il loro cervello principia a stancarsi comincia la distrazione, ed essendo in essi i poteri inibitori ancora poco sviluppati, raramente con un energico sforzo di volontà si ripongono al lavoro; essi lo ricominciano soltanto quando si sono riposati. A quest'ordine d'idee mi condusse anche l'osservazione continua che esercitavo sul piccolo inserviente che lavorava con me. In ogni esperienza dopo un certo tempo lo vedevo interrompere il lavoro, alzare gli occhi e tenerli fissati nel vuoto, oppure per timore che io me ne accorgessi, tenerli abbassati sul tavolo in attitudine di chi lavora senza però continuare nei suoi calcoli. Quando lo richiamavo, e ciò succedeva di frequente specialmente verso la fine di ogni esperienza, spesso trasaliva ed io comprendevo che avveniva in lui uno sforzo per richiamare la propria attenzione sul còmpito impostogli. È appunto a queste frequenti distrazioni, che gli davano modo di riposarsi non ostante la mia diretta sorveglianza, che io attribuisco il minore spostamento della resistenza minima verificatosi in lui in confronto a quello osservato su di me.

La diminuzione del contenuto emoglobinico del sangue da me osservata in seguito allo strapazzo mentale potrebbe trovare la sua spiegazione sia dalla scomparsa dal circolo di un certo numero di globuli, scomparsa che, come abbiamo visto, più che dalle variazioni dei risultati ottenuti col conta-globuli è indicata dal risalire isolato della resistenza minima, sia, e più probabilmente, dal difetto di ossigenazione della massa sanguigna.

Da quanto sono venuto finora esponendo parmi di poter dedurre che l'anemia degli studiosi, oltre che alle alterazioni del ricambio, dovute alla insufficiente ingestione di cibo e all'azione diretta del sistema nervoso, oltre che alla deficente ossigenazione del sangue per le modificazioni del ritmo respiratorio, possa esser dovuta, almeno negli individui capaci di spingere, mediante la volontà, il lavoro cerebrale al grado di strapazzo, all'influenza di sostanze tossiche, dovute appunto al lavoro cerebrale e aventi azione diretta sulla resistenza dei globuli rossi del sangue, come dal risalire isolato della resistenza minima viene ad essere indicato.

BIBLIOGRAFIA.

BADALONI. *La scrittura dritta e la scrittura inglese. Influenza della scrittura sulla funzione del respiro.* International Archiv f. Schulhygiene. II Band, 3 Heft, 1906.

BINET. *La fatigue intellectuelle.* Paris, Ed. Schleider frères, 1898.

GALLERANI. *Resistenza della emoglobina nel digiuno.* Annali di chimica e farmacologia, 1892.

IGNATIEFF. *Der Einfluss der Examina auf das Körpergewicht.* Zeitschrift für Schulgesundheitspflege, 1898.

IONA. *La resistenza del sangue del feto e del neonato.* Riforma medica, 1895.

KOSINZOFF. *Der Rinfluss der Examina auf die Gesundheit der Schüler.* Wratsch. n. 52, 1898.

LESAGE. *De l'influence de quelques conditions physiologiques sur la résistance globulaire.* Comptes-rendus de la Société de Biologie, 1900.

MACDONALD. *Ueber der Einfluss der Gehirnarbeit auf die Atmung der Schüler.* Zeitschrift für Schulgesundheitspflege, 1896,

MANCA. *Influenza della fatica muscolare sulla resistenza dei globuli rossi del sangue.* Comunicazione preventiva. Lo Sperimentale, Sezione biologica, anno X, fasc. V e VI, 1895.

MARFAN. *Dello strapazzo fisico e dei suoi effetti morbosi.* Gazette des Hôpiteaux, 1901.

MOSSO. *La fatica.* Milano. 1892.

MOLON e GASPARINI. *Ricerche fisico-chimiche del sangue nel digiuno, resistenza delle emazie, crioscopia, conducibilità elettrica.* Lavori della Clinica medica di Padova, 1903.

OBICI. *Ricerche comparative sulla resistenza globulare nei vecchi alienati e nei vecchi normali.* Rivista di patologia nervosa e mentale, 1901.

ID. *Influenza del lavoro intellettuale prolungato e della fatica mentale sulla respirazione.* Rivista sperimentale di freniatria, 1903.

PETER. Citato nel lavoro di MARFAN (V. sopra).

SERAFINI. *Sull'alimentazione dello studente universitario italiano.* Annali d'igiene sperimentale, 1896.

SCHMID-MONARD K. *Die kronische Kranklichkeit in unseren mittleren und höheren Schulen.* Zeitschrift für Schulgesundheitspflege, 1897.

VIOLA. *Il metodo per la misurazione delle resistenze dei globuli alle soluzioni clorosodiche.* Lavori della Clinica medica di Padova, 1903.

ID. *Le resistenze dei globuli rossi alle soluzioni clorosodiche e i fattori principali che le influiscono.* Idem.

ID. *L'ematopoiesi da allattamento e l'aumento della resistenza media.* Id.

ZANIER. *Sulla resistenza del sangue fetale.* Gazzetta degli ospitali, 1895.

HUBBELS. *Vergleichende Untersuchungen von mutterlichen Blute, foetalem Blute und Fruchtwasser.* Inaugural Dissertation. Giessen, 1901.

ISTITUTO D'IGIENE DELLA R. UNIVERSITÀ DI PADOVA

Sul comportamento del potere battericida del polmone di fronte ad alcune cause che possono modificarlo.

Ricerche sperimentali del dott. **ENRICO RONZANI**, aiuto.

Si credeva fino a pochi anni or sono che l'aria inspirata, giungesse negli alveoli polmonari priva di germi, in seguito alla filtrazione che essa veniva a subire passando attraverso alle prime vie respiratorie, e che perciò il polmone sano, nel vero senso della parola, fosse un organo privo di microrganismi.

In appoggio a questa teoria stavano le osservazioni del Weichselbaum, del Babes, e di altri, i quali nei polmoni di uomini sani morti di lesioni violente non trovarono mai microrganismi, e quelle dell'Hildebrandt, del Neisser, del Klipstein, del Göbell che nei comuni animali da esperimento (conigli, topi) non rintracciarono che raramente qualche germe, la presenza del quale si credeva dovuta ad inevitabili errori di tecnica.

Fu il Dürck fra i primi a rilevare che il polmone non è invero un organo privo di germi, ma che fino nei più piccoli alveoli i microrganismi si possono trovare anche in notevole quantità.

Tale studio fu allora ripreso dal Barthel, dal Beco, dal Boni, dal Nenninger e dal Quensel, dalle esperienze dei quali si può concludere che quantunque una grandissima parte dei germi sospesi nell'aria che viene inspirata, venga trattenuta dal naso, faringe, laringe e grossi bronchi mercè la loro speciale costituzione, pure una piccola parte, proporzionale al numero stesso dei germi dell'aria, penetra negli alveoli. Il modo nel quale avviene tale penetrazione fu studiato in special modo dal Buchner, dal Flügge, dal Koeniger e dal Paul; i quali, pur esperimentando in condizioni diverse, vennero alla conclusione che i germi penetrano nel polmone trovandosi aderenti a finissime particelle liquide e solide trasportate dalla corrente d'aria.

Dagli stessi osservatori è stato poi notato l'importantissimo fatto che cioè i microrganismi penetrati nel polmone vengono rapidamente a scomparire; infatti essi riscontrarono che, dopo breve tempo dall'inalazione sperimentale d'un dato germe saprogeno, esso non si ritrova più nei polmoni, fatto questo che ci viene a spiegare come i primi ricercatori trovassero, in certe condizioni, il polmone privo di microrganismi.

In base adunque a queste constatazioni si è dovuto ammettere che il polmone sia dotato di mezzi di difesa tali da uccidere o da allontanare in breve tempo i germi in esso penetrati.

Vediamo ora per quali forze possedute dal polmone questi germi vengano allontanati o distrutti.

Si sapeva per i lavori dell'Jns, dell'Arnold e di altri, che le particelle di polvere penetrate nei polmoni venivano in gran parte inglobate da speciali cellule chiamate allora cellule a polvere, che l'Jns e Slavjansky credevano derivanti dai leucociti poichè ad essi assomigliavano; che il Ruppert e Fleiner opinavano di origine epiteliale e che infine Arnold e Schottelius propendevano per la doppia loro origine, che cioè le cellule grandi fossero di origine epiteliale e quelle più piccole di origine linfoide.

Apertosi successivamente questo nuovo quesito per la batteriologia, di stabilire cioè a quale forza fosse dovuta la scomparsa dei germi penetrati nel polmone sano, non mancarono gli sperimentatori a portare il loro contributo in un così importante argomento che doveva spiegare la funzione che ha il polmone in rapporto allo sviluppo di molte malattie infettive. Le esperienze in proposito furono fatte sui comuni animali da laboratorio.

Il Fleck facendo inalare ai suoi animali d'esperimento lo stafilococco piogeno-aureo e sacrificandoli dopo un certo periodo dall'inalazione, riscontrava nelle sezioni dei polmoni che le cellule epiteliali ed i leucociti avevano inglobati grandissima parte degli stafilococchi e che perciò spetta a questi due elementi la scomparsa dei germi dal polmone.

Un fatto analogo fu osservato dal Muskatbbuth per il B. del carbonchio.

Il Laehr invece introducendo nella trachea di conigli delle colture di stafilococco, trovava, dopo qualche ora, all'esame dei polmoni, tutti i cocchi inglobati dalle sole cellule epiteliali, entro alle quali i cocchi stessi subivano una trasformazione regressiva e finivano per scomparire.

Il Ribbert d'altro canto, esperimentando con le spore di *aspergillus flavescens*, vide solo i lencociti negli alveoli polmonari e nei capillari che circondavano queste spore e ne arrestavano lo sviluppo.

Infine il Buchner, che molte osservazioni fece in proposito, e che tanta luce ebbe a portare nella teoria dell'immunità e della difesa dell'organismo in rapporto alle malattie infettive; osservò che nei polmoni dei sorci nei quali aveva fatto penetrare i B. del colera dei polli, tali bacilli venivano inglobati dai leucociti e non dalle cellule epiteliali.

Dalle differenti osservazioni dei su citati autori risulta adunque che pur accordandosi essi nel riconoscere una forza distruttrice dei germi da parte del polmone, divergono nello stabilire a quali elementi sia affidata una tale funzione. Sembra però che il Tchistovitch, per suggerimento del Metchnikoff, abbia, se non completamente spiegato l'arduo problema, por-

tata maggior luce in argomento. Dalle sue esperienze risulta che in seguito alla penetrazione di germi nel polmone i primi ad accorrere sul posto sono i leucociti i quali più tardi ipertrofizzandosi si trasformano in grossi macrofagi a forma epitelioide con proprietà eminentemente fagocitiche, ragione per cui a seconda dei diversi periodi d'osservazione i precedenti autori ora credevano che fossero solo i leucociti capaci di inglobare i germi, ora le cellule epiteliali ed ora tutti e due, considerando quest'ultime di natura diversa dai primi; mentre secondo l'A. essa è unica. Tale trasformazione nei polmoni si avvererebbe rapidamente per condizioni speciali dell'epitelio alveolare.

Vengono infine le esperienze recenti del Paul il quale cercò di stabilire se veramente la diminuzione rapida dei germi penetrati nel polmone avvenga per la distruzione degli stessi per azione fagocitica con partecipazione delle altre azioni biochimiche, oppure per trasporto mediante la corrente linfatica nei gangli prossimiori, come da molti altri autori era sostenuto.

Egli condusse i suoi esperimenti in modo diverso dai precedenti osservatori. Anzitutto vide che facendo inalare a dei conigli delle colture liquide di B. prodigioso, e ricercando in alcuni subito ed in altri dopo alcune ore, il numero dei germi inalati nei polmoni dei differenti conigli, trovava costantemente negli ultimi animali esaminati una diminuzione notevolissima del numero dei bacilli.

In base a tali risultati volle vedere se facendo inalare ai conigli anzichè il B. prodigioso. delle spore di *B. subtilis*, che, come si sa dai lavori del Wisokowcz, non si sviluppano nell'organismo animale, queste ultime sarebbero scomparse dal polmone colla stessa rapidità colla quale scomparivano i *B. prodigiosus*, la quale cosa, se fosse avvenuta, avrebbe dimostrato che spetta alla corrente linfatica l'allontanamento dei germi dal polmone; mentre se le spore si fossero ritrovate dopo un certo tempo ancora nel polmone stesso, non si sarebbe trattato più di un semplice allontanamento dei germi, ma d'una azione distruttrice del polmone in sito dei microrganismi, azione che non si poteva esplicare sulle spore.

Infatti, egli riscontrò che mentre nella prima esperienza, dopo 17 ore dall'inalazione i *B. prodigiosus* inalati erano quasi totalmente scomparsi dal polmone, per le spore del *B. subtilis*, dopo 24 ore, nei mezzi colturali se ne svilupparono oltre la metà di quelle fatte inalare; per cui egli venne alla conclusione che la diminuzione rapida dei germi inalati che si avvera nel polmone spetta specialmente all'azione distruttrice propria del polmone stesso; e che solo in piccola parte vi concorre la corrente linfatica, poichè piccolo fu il numero dei germi riscontrati nelle ghiandole linfatiche peribronchiali.

Dai dati fin qui raccolti risulta adunque abbastanza chiaramente che il polmone sano è provvisto di un potere di difesa contro i germi, i quali in gran parte vengono distrutti in sito da speciali azioni biochimiche, non ancora completamente note, ma che certamente tra queste hanno il primo posto la fagocitosi e le sostanze battericide del sangue.

Ma questo potere di difesa è una estrinsecazione dell'organismo costante e duratura, ovvero, date alcune speciali condizioni d'ambiente, subisce piuttosto delle modificazioni nella sua essenza, tali da farne diminuire il valore, da danneggiarlo, da toglierli in parte quella benefica azione protettrice su mentovata?

Tale è l'argomento delle mie ricerche, e cioè:

Indagare direttamente sul polmone quali modificazioni tale potere difensivo viene a subire, sottoponendo gli animali ad alcune condizioni anormali di indole generale, ai quali l'organismo può facilmente essere esposto.

Le condizioni anormali alle quali ho sottoposto gli animali sono le seguenti:

1° Freddo;
2° Rapidi passaggi di temperatura;
3° Caldo;
4° Bagno;
5° Fatica;
6° Traumi;
7° Inalazioni di varie polveri;
8° Alcoolismo acuto e cronico.

Naturalmente a queste era collegata anche la ricerca per vedere, negli animali che io ho prescelto (cavie), fino a qual punto giunge nello stato fisiologico ed in condizioni normali d'ambiente il potere di difesa del polmone contro un germe all'uopo scelto, giacchè le ricerche del Paul, in parte innanzi ricordate, e che specialmente a ciò sono rivolte, furono eseguite solamente sul coniglio.

***

La scelta dell'animale e la tecnica da usare per mettermi al riparo dalle numerose critiche, data la difficoltà delle indagini, non è stata certo la preoccupazione minore in questi miei esperimenti.

Ho escogitato, per quanto fu in mio potere, tutti i mezzi possibili per rendere le numerose operazioni più semplici e più rapide senza esagerare da un lato, nè tanto meno mancare dall'altro.

Gli animali da me usati furono le cavie, e la tecnica d'indole generale seguìta fu la seguente.

Anzitutto le operazioni che per ogni serie di esperienze io dovevo fare erano le seguenti:

1° Far inalare agli animali coll'aria delle finissime goccioline di brodocoltura del germe in studio.

2° Uccidere l'animale dopo un determinato periodo di tempo e fare la ricerca quantitativa del numero dei germi ancora contenuti nel polmone; per la quale indagine occorreva:

a) estrarre nel modo più rapido possibile i pezzi di polmone da esaminare;

b) determinarne il volume e farne la triturazione;

c) fare le piastre;

d) eseguire il conteggio delle colonie e rapportare il numero dei germi trovato ad 1 cmc. di polmone.

Per la prima operazione ho usata la mia cassetta per inalazioni che ebbi a descrivere in un precedente mio lavoro sull'azione della polvere di carbone sui microrganismi (*questi annali 1905*).

Tale cassetta offre il vantaggio, di fronte agli altri metodi ed apparecchi per innesti di germi nelle vie respiratorie, di impedire che la penetrazione dei germi polverizzati avvenga per altre vie che non sieno le aeree, togliendo di mezzo anche la bocca per essere questa una via d'entrata comune agli organi del respiro e della digestione. Con tale apparecchio venivo ad evitare, non infettando la bocca degli animali in esperimento, il pericolo di far penetrare nel polmone durante la brevissima agonia dei piccoli animali, alcuni germi che nella bocca eventualmente si sarebbero trovati; penetrazione possibile, come ebbe a dimostrare sperimentalmente il Klipstein ed il Göbell, per cui fu mossa critica alle esperienze del Dürck, del Boni e di altri.

Le modificazioni aggiunte alla mia cassetta per questo nuovo genere di esperienze, furono le seguenti:

Fu aumentato il numero degli animali che essa poteva contenere, e fu applicato alla sua parte superiore un grosso tubo metallico ricurvo (diametro 25 mm.) per portare entro alla stessa l'aria carica delle piccolissime goccioline contenenti i germi per l'innesto. Tale tubo veniva con una estremità ben fissato alla cassetta, coll'altra penetrava nel collo di una grande bottiglia, della capacità di circa 10 litri, entro la quale veniva polverizzata la coltura. La bottiglia, oltre all'apertura superiore, ne possedeva un'altra laterale-inferiore, per la quale penetrava un tubo di vetro ed un comune polverizzatore contenente 150 cmc. di brodocoltura di 36 ore di *B. prodigiosus*; tale apertura veniva chiusa ermeticamente allorchè il polverizzatore era in funzione.

Dall'esterno mercè una pera di gomma a corrente continua facevo funzionare il polverizzatore stesso, e mercè una pompetta metallica in comunicazione col piccolo tubo di vetro penetrante nella bottiglia venivo ad aumentare in essa leggermente la pressione in modo da cacciare, attraverso il tubo, entro alla cassetta solo le piccolissime goccie di brodocoltura, cioè in gran parte solo quelle, che, come han dimostrato il Flügge, il Buchner, il Köeniger ed il Paul, possono penetrare fino negli alveoli polmonari.

Dirò subito le ragioni che indussero anche me a scegliere per le mie esperienze il *B. prodigiosus*.

Anzi tutto io dovevo esperimentare con un microrganismo saprogeno

e fare la ricerca di esso, dopo determinati periodi di tempo nei polmoni degli animali, nei quali eventualmente potevano trovarsi degli altri germi.

Perciò il *B. prodigiosus*, per la sua proprietà di dare nei comuni mezzi di coltura un bel pigmento rosso, mi metteva nella condizione di facilmente identificarlo; tanto più che tale germe, dopo aver attraversato il polmone delle cavie acquista un potere cromògeno notevolissimo anche se tale potere da prima fosse assai scarso. Di più il *B. prodigiosus*, si sviluppa facilmente a 37° C. pur non essendo patogeno inoculato in quantità non eccessive, facilmente si adatta negli organi animali.

Ho scelte cavie presso a poco dello stesso peso, le quali venivano introdotte nella cassetta dove facevo pervenire le finissime goccie di brodocoltura di *B. prodigiosus* per la durata di 20 minuti, dopo di che venivano tolte ed uccise entro periodi di tempo fissati.

Le autopsie erano fatte in locali perfettamente separati da quelli nei quali si facevano le inalazioni, e l'operatore si cambiava di veste e procedeva alla pulizia delle mani.

Per ogni autopsia, la cavia prima dell'uccisione veniva rasa dei peli nella regione toracica inferiore, disinfettata la cute, e sacrificata con un energico colpo sulla nuca. Quindi veniva posta sopra un tavolo di autopsia, inclinato dall'avanti all'indietro di 45°, in modo, che quivi distesa, rimanesse colla testa in basso e la parte posteriore del corpo sollevata, per impedire che l'eventuale secreto bronchiale contenente dei germi inalati dovesse durante il brevissimo tempo dell'operazione discendere nelle parti più profonde. Infine, scollata rapidamente la cute, aperta la cassa toracica con pochi colpi di forbice in pochi secondi dalla morte, estraevo con tutte le norme dell'asepsi i pezzetti di polmone che mi sarebbero serviti per la ricerca.

Il Paul per porsi al riparo dalla critica fatta ad alcuni precedenti osservatori, che cioè durante l'agonia dell'animale nelle inspirazioni agoniche, dei germi della bocca e vie aeree superiori potevano penetrare negli alveoli, asportava i pezzi di polmoni necessari per la ricerca ad animale vivo.

Pur io evitando, col metodo da me usato di far penetrare il *B. prodigiosus* nella bocca delle cavie, volli vedere, prima d'iniziare le mie ricerche, se fosse stato più opportuno asportare i pezzetti di polmone ad animale vivo, secondo il metodo del Paul, o subito dopo morto. Esperimentando all'uopo m'accorsi che operando l'animale vivo, per quanto ci si sforzi con svariati mezzi d'impedirlo, l'animale grida, si dibatte, deglutisce, movimenti tutti che possono maggiormente facilitare la discesa dei germi dalle vie aeree superiori nelle inferiori, di quello che avvenga per qualche inspirazione agonica che nei piccoli animali è superficiale, di brevissima durata e rara.

Per tali ragioni mi decisi di togliere i pezzi di polmone da esaminare ad animale appena ucciso, completando l'operazione, come dissi, in qualche minuto dalla morte.

I pezzetti di polmone presi in esame erano sempre gli stessi per ciascun animale, e cioè: l'*apice del polmone destro, una porzione del lobo inferiore destro presa a* ½ del lobo stesso con grosso bronco, infine una porzione *della base del lobo inferiore sinistro.*

Dovendo fare la ricerca quantitativa dei germi che venivano a trovarsi in queste porzioni di polmone, e rapportare quindi questo numero ad 1 cmc. di polmone stesso, mi è sembrato cosa estremamente necessaria di procedere, di volta in volta che ne facevo l'estrazione, alla determinazione più esatta possibile del volume preso in esame; convinto che in tal modo soltanto si sarebbero potute trarre delle conclusioni per confronto, dai risultati dell'esame dei numerosi pezzi dei vari animali.

Il Paul, il Nemmieger ed altri si accontentavano di determinare solo approssimativamente la grandezza del pezzo di polmone in istudio, paragonandolo a corpi noti, quali un pisello, una fava, ecc., e ricorrendo solo raramente alla bilancia, tanto per avere un'idea approssimativa del peso dei loro pezzi.

L'uso della bilancia per una tale determinazione non mi è sembrato in vero il più pratico, sia per le numerose manipolazioni che si avrebbero dovuto fare per preservare il pezzo dagli inquinamenti, sia perchè la pesata esatta è una operazione lunga, per cui e si avrebbero potuti avere degli errori in altro senso, e sarebbe aumentata la perdita di tempo, dato il grande numero di pezzi da me esaminati (circa un migliaio).

Per tutto ciò adunque ho escogitato un metodo, che a mio avviso oltre che essere semplice, permette di determinare il volume del pezzo in esame e di farne contemporaneamente la triturazione senza ulteriori trasporti, evitando così i facili inquinamenti che si possono avere eseguendo questa ultima operazione coi soliti mortai sterili. Infatti l'uso del mortaio per la triturazione degli organi, da eseguirsi sterilmente a scopo di ricerche batteriologiche, non è nè pratico nè sicuro, poichè coi movimenti che si debbono imprimere al pestello, per ottenere lo scopo, non è possibile tenere ben coperto il mortaio, di più, l'organo, specie se un po' consistente, scivola con facilità disotto al pestello stesso e non si riesce che con grande pazienza a schiacciarlo ed a trasformarlo in poltiglia.

Il metodo da me usato fu il seguente:

Prendevo dei comuni piccoli cilindri di vetro della capacità di cmc. 5, 10, 15, a seconda della grandezza del pezzo in esame, graduati al 1/10 o meglio a 1/20 di cmc.

Introducevo in essi degli speciali pestelli da me costruiti, formati da brevi pezzi cilindrici di vetro del diametro di poco superiore della metà del diametro dei cilindri recipienti, aventi la base rivolta verso il basso, piana a margini taglienti, quella superiore arrotondata e portante ben fissata un'asticella sottile, ma resistente, d'acciaio, di lunghezza tale da uscire dai cilindri graduati per 7 od 8 centimetri. La bocca di questi ultimi veniva chiusa con un tappo di cotone attraversato dall'asta del pestello succennato.

Così preparati, introducevo in essi cmc. 1 o 2 di acqua distillata, e sollevato il pestello dal fondo tanto da non toccare il liquido, venivano posti nell'autoclave a sterilizzare.

Al momento dell'uso, leggevo sulla graduazione esterna del cilindro, l'altezza alla quale arrivava l'acqua nel suo interno, e mentre tagliavo con istrumenti sterili il pezzetto di polmone da esaminare, nel modo su accennato, un assistente tenendo inclinato il cilindro di 45°, toglieva il tappo col pestello, mi lasciava introdurre rapidamente il pezzetto d'organo che

veniva immerso, e richiudeva, badando sempre che il pestello rimanesse sollevato dall'acqua stessa, Rileggevo l'altezza a cui giungeva dopo ciò il liquido e facendo la differenza fra le due letture ottenevo il volume dell'organo. Passavo quindi alla triturazione dello stesso, che veniva eseguita per mezzo di movimenti in senso perpendicolare e circolare del pestello tenuto per l'asta metallica uscente dal tappo. A principio, supponendo che il polmone per il suo contenuto d'aria non rimanesse bene immerso nell'acqua, mi ero prefisso di tenervelo immerso col pestello, previa determinazione del volume di questo; ma in pratica vidi che i vari pezzi, quantunque non affondassero completamente, rimanevano però sempre immersi nell'acqua stessa, e solo raramente ebbi bisogno di una tale pratica.

In tale modo riescivo sempre in breve tempo ad ottenere coll'acqua contenuta nel cilindro una specie di emulsione, colla quale facevo le piastre, distribuendo prima il contenuto di ogni cilindro in tre scatole Petri, e quindi risciacquando lo stesso con altra acqua sterile, che versavo a sua volta in una quarta scatola.

Al principio facevo anche col cilindro dopo la risciacquatura, una piastra arrotolata alla Ersmarch, previa introduzione in esso di agar, ma in seguito vedendo che il più delle volte germi non si sviluppavano, tralasciai per risparmio di tempo tale operazione.

Le piastre così fatte erano poste in termostato a 35° C., temperatura alla quale il *B. prodigiosus*, si sviluppa benissimo.

Dopo 24 o 48 ore, procedevo al conteggio delle colonie coi soliti metodi, ed il numero complessivo trovato nelle 4 piastre per ciascun pezzo d'organo, il cui volume mi era già noto, veniva rapportato ad 1 cmc. di polmone; e poichè per ogni animale esaminavo tre pezzi di polmone facevo poi una media complessiva del numero dei germi per centimetro cubo; come apparirà chiaro nelle tabelle seguenti.

Convinto che tale studio poteva riescire proficuo solo esperimentando sopra un grande numero d'animali e ripetendo le esperienze sopra varie serie di essi, ebbi a esperimentare su circa 300 cavie comprese le ricerche preliminari o di scandaglio, per togliere di mezzo alcune differenze individuali che sempre si presentano in osservazioni di tal genere.

Potere di difesa del polmone di cavie sane in condizioni normali d'ambiente.

Ricerche in proposito per stabilire in quale misura avvenga la distruzione dei microrganismi entro al polmone degli animali sani, furono fatte, come ebbi a dire più addietro, da Paul, il quale sperimentò col coniglio e concluse che il polmone dei conigli dopo 1 $^1/_4$ ora dall'inalazione era capace di distruggere $^9/_{10}$ dei *b.* in esso penetrati e dopo 17 $^1/_2$ ore quasi tutti.

Le mie esperienze furono invece eseguite sulle cavie (n. 28) ed i risultati rispettivi sono riassunti, con tutti i dati necessari, nella Tabella I, avvertendo che la lacuna esistente tra le ore 16 e

le ore 28 nella 1ª esperienza è dovuta alle tarde ore della notte interposta, e che nella 2ª veniva eseguita la ricerca contemporaneamente su due animali, per poter così porre in evidenza le differenze individuali, ed avere quindi un criterio più esatto sul modo d'interpretare in seguito i vari risultati.

Dai risultati delle ricerche esposti nelle suddette tabelle, che sono riportate in fine di questa memoria, parmi dover concludere:

I. *Che un gran numero di microrganismi può penetrare coll'aria inspirata nei polmoni delle cavie, come fu osservato da molti altri autori per altri animali.*

II. *Che il numero dei microrganismi penetrati nel polmone va rapidamente diminuendo fino a scomparire entro 48 ore; quindi che il polmone sano appena i microrganismi sono in esso pervenuti reagisce energicamente contro di essi, reazione che va gradatamente diminuendo senza però scomparire.*

III. *Che in generale tutte le parti del polmone reagiscono contro i microrganismi inalati pressochè egualmente, nessuna differenza costante essendosi verificata nè da parte dell'apice del polmone destro, nè del lobo inferiore destro, nè della base del polmone sinistro.*

Io non voglio qui entrare nella natura del potere di difesa del polmone contro i germi; probabilmente, come ebbi a dire altrove, esso è dovuto ad un complesso di fattori, fagocitosi, potere battericida del sangue, secreto dell'epitelio polmonare, corrente linfatica ecc. Voglio invece constatare che un tale potere difensivo è notevolmente energico anche nel polmone delle cavie, poichè esso raggiunge a distruggere circa 20,000 *B. prodigiosus* per cc. in meno di 48 ore.

Premesso così, per le ragioni già dette, lo studio del polmone delle cavie sane nella sua difesa contro i germi inspirati, vengo all'argomento principale del mio lavoro, cioè alla ricerca delle modificazioni che tale potere di difesa viene a subire mutando le condizioni di vita o di ambiente degli animali in esperimento.

Azione del freddo.

L'azione del freddo sull'organismo può essere causa di modificazioni tali degli organi interni da diminuirne notevolmente la resistenza specie nella lotta contro i microrganismi; essendo però le modificazioni, alle quali i tessuti vanno incontro per tale azione, oltremodo complesse, non si è potuto ancora avere un giusto criterio sul modo d'insorgenza di alcune malattie infettive.

Prima che la batteriologia iniziasse i suoi studi in proposito, si riteneva il raffreddamento come causa diretta di numerosissimi morbi; di circa un'ottantina secondo Schonlein.

Successivamente, come accade ogni qual volta sorgono delle nuove teorie, si tolse al freddo qualsiasi importanza eziologica, e si ritenne d'aver spiegato completamente anche la questione delle malattie a frigore colla sola presenza dei microrganismi. Ma la necessità della disposizione individuale, oltre alla presenza dei microrganismi patogeni, e il fatto che tale disposizione viene a stabilirsi o ad accrescersi per azione di altre cause agenti sull'organismo, fecero annoverare appunto il freddo fra le cause predisponenti delle così dette malattie a frigore.

Come avvenga una diminuzione di resistenza in seguito al raffreddamento, è un argomento dei più controversi della patologia, e numerose perciò sono le esperienze e le teorie emesse in proposito.

Fu il primo il Pasteur a ridare all'azione del freddo sull'organismo la parte che purtroppo gli spetta nella genesi di alcune malattie, inquantochè, come è noto riuscì raffreddando i polli a renderli suscettibili al carbonchio al quale generalmente essi sono refrattari. Successivamente confermarono le suddette esperienze i lavori di Wagner e del Sawtschenko per la stessa infezione, quelli dell'Ernst per l'infezione da *B.* ranicida sulle rane raffreddate, quelli del Filehne per l'eresipela sui conigli raffreddati, ed altri ancora, per cui non vi fu allora dubbio alcuno sull'azione debilitante del freddo sull'organismo nei riguardi delle malattie infettive.

Quale fosse poi il suo meccanismo d'azione, fu studiato dal Massalongo, dal Heidenhain e dal Lipari. Quest'ultimo spiega il più facile attecchimento dei microrganismi in seguito al raffreddamento con una paralisi degli epitelii e conseguente iperemia e tumefazione della mucosa dal freddo provocata, per cui si avrebbe in seguito la discesa dei germi patogeni negli alveoli polmonari.

Altri osservatori però non divisero allora l'opinione del Lipari. Infatti il Lode, che esperimentò per diverse malattie infettive negli animali raffreddati, crede invece che la maggiore disposizione del polmone ad ammalare in seguito al raffreddamento sia dovuto esclusivamente alle alterazioni della naturale economia del calore, la quale conduce ad una diminuzione più o meno intensa del calore generale.

Il Kisskalt però non è di tale avviso, giacchè egli non crede che il raffreddamento della periferia del corpo venga a raffreddare gli organi interni e per tale fatto a toglierne la resistenza; ma basandosi sulle esperienze del Hofbauer, dell'Heidenhain, dell'Hamburger, ritiene sia invece la conseguente iperemia arteriosa che reca danno agli organi interni, sia per la diminuita alcalinità del sangue (negata dal Lode), sia per le migliori condizioni di vita e per la maggior quantità di ossigeno che trovano i germi in tale condizione, sia infine per la diminuzione di resistenza dei tessuti che l'A. vuole si abbia in una iperemia arteriosa.

Se però le obiezioni mosse dal Kisstralt al Lode possono essere giuste inquantochè la teoria di quest'ultimo poco viene a spiegare, essendo stata da molti altri osservatori, tra i quali il Liebermeister, riscontrata negli organi interni, in seguito al raffreddamento del corpo, sempre una iperemia ed il più spesso aumento di temperatura; pure non è altrettanto persuasiva

anche la sua idea che una iperemia arteriosa debba diminuire la resistenza di un dato organo. Infatti lo Strasser osserva che i processi articolari di origine infettiva vengono bene influenzati da una iperemia arteriosa, mentre invece è la iperemia da stasi quella che agisce su di essi assai sfavorevolmente; e perciò crede col Ruhemann e Filehne che il sovraccaricarsi di sangue del polmone in seguito ad un raffreddamento del corpo debba avere più il carattere di una stasi anzichè di una iperemia attiva, la quale stasi deve a sua volta portare delle modificazioni e nel chimismo cellulare dei componenti i vari tessuti, alterarne così la loro vitalità e resistenza creando un *locus minoris resistentiae*, e producendo se si vuole delle alterazioni anatomiche vere e proprie come ebbe a dimostrare il Lipari e a sostenere lo stesso Strasser per la pneumonite.

Tale teoria invero sembra la più attendibile.

Però dalle mie esperienze parmi dover concludere che, pur ammettendo che nel polmone avvengano le modificazioni più sopra accennate le quali preparano così il terreno allo sviluppo dei germi, una alterazione notevole viene a subire, in seguito al raffreddamento, appunto quel potere di difesa di cui è dotato il polmone contro i germi: che cioè; in altri termini, venga ad essere modificata notevolmente la immigrazione dei leucociti non solo, ma il loro potere fagocitico e alterata l'azione delle sostanze battericide, per lo che i germi non vengono distrutti, e trovano nelle lesioni innanzi accennate un terreno più favorevole allo sviluppo. Ciò si accorda anche colle esperienze del Bouchard e dell' Holm, che hanno studiato la fagocitosi negli animali raffreddati.

Esperienze. — Le cavie venivano, come al solito, introdotte nella cassetta polverizzatrice, a respirare coll'aria i *B. prodigiosus*, per la durata di 20 minuti. Dopo di che una di esse veniva subito uccisa per stabilire il numero dei germi da esse cavie approssimativamente inalato. Contemporaneamente, le restanti venivano divise in due gruppi, dei quali uno rimaneva entro il laboratorio a 15° C., l'altro veniva esposto all'azione del freddo.

Per operare il raffreddamento degli animali ho voluto mettermi nelle condizioni più naturali possibili. Non ho voluto perciò raffreddarli nè colla depilazione, nè col bagno, come ebbe a fare il Lode ed il Lassar; nè coll'etere (Massolongo, Lipari, Kasparek), nè col ghiaccio (Filehne), nè infine cogli antipiretici (Wagner) ma, poichè la stagione mi era propizia, esponendoli semplicemente alla temperatura esterna, che durante le mie esperienze variò da un minimo di — 1° C., ad un massimo di + 5° C.

Così tenuti gli animali, di 12 in 12 ore, venivano sacrificati assieme ai controlli tenuti nel laboratorio, e colla stessa tecnica

usata nelle precedenti ricerche, facevo la determinazione quantitativa del *B. prodigiosus* contenuto nei polmoni. Debbo notare che i polmoni delle cavie esposte al freddo apparivano all'autopsia congesti, fatto che non ebbi a riscontrare nelle cavie controllo.

Per avere dei dati sui quali poter trarre delle conclusioni, ebbi a ripetere tale esperienza in tre differenti periodi.

I risultati vengono riassunti nella TABELLA II (*v. a pag. 86 e 87*).

Le cifre esposte in questa tabella, sono già per sè stesse dimostrative. *Appare infatti chiara una diminuzione del potere di difesa del polmone contro il* B. prodigiosus *nelle cavie che furono esposte al freddo, sia per il numero maggiore di bacilli costantemente ritrovato nei polmoni di queste ultime, sia per il maggior tempo impiegato dal polmone alla loro completa distruzione (oltre 72 ore), periodo abbastanza lungo qualora si consideri che in meno di 48 ore il polmone sano in condizioni normali è capace di uccidere oltre 20,000* B. prodigiosus. (Tabella I).

Azione dei bruschi passaggi di temperatura.

Constatato che l'azione continuata del freddo sull'organismo produce una diminuzione della forza protettrice del polmone contro i germi, volli vedere se agiscano in senso più o meno dannoso i bruschi passaggi da una temperatura relativamente alta ad una più bassa; i quali sono in genere ritenuti maggiormente dannosi, e durante i quali si dovrebbe avere *a priori* un disordine maggiore, sia nelle azioni riflesse vasomotrici, sia nel complesso ambiente biochimico polmonare.

A tale scopo, tenendo sempre gli animali controllo alle temperature di 15° C., ponevo gli altri entro un termostato per animali a 30°-35° C. per la durata di tre ore, e quindi rapidamente venivano passati in una ghiacciaia a 0° + 1° C. per altre tre ore, e così alternativamente fino al momento dell'uccisione. In questa ricerca, operando sempre nello stesso modo, per risparmio di animali, ho omesso di determinare il numero dei germi inalati dalle cavie appena uscite dalla cassetta polverizzatrice, sia perchè abbiamo visto nelle antecedenti ricerche, che tale numero varia in media da 15,000 a 20,000 per cmc. di polmone, sia perchè a testimonianza delle possibili variazioni, esistono sempre i dati degli animali controlli.

Anche qui ho ripetuto tre volte le esperienze per avere dei risultati apprezzabili, che sono raccolti nella TABELLA III (*v. a pag. 88 e 89*).

Riassumendo i risultati esposti in questa tabella, si può dire *che*

negli animali sottoposti a bruschi passaggi di temperatura, il potere di difesa del polmone contro i microrganismi viene da principio notevolmente diminuito più di quello che avvenga per gli animali esposti all'azione continuata del freddo; ma tale potere sembra successivamente riprenda in parte il suo vigore, tanto che il polmone riesce a distruggere tutti i germi inalati in un tempo più breve di quello impiegato dai polmoni delle cavie della precedente ricerca.

Per cui si potrebbe dire, che a principio il polmone resta fortemente scosso dai rapidi passaggi di temperatura, ma che poi lentamente ad essi si assuefà e riprende presso a poco il suo stato normale, senza però raggiungerlo completamente.

Ciò si accorda colle idee espresse dal Pieraccini nel suo trattato delle malattie del lavoro. L'autore, parlando degli operai che per la loro professione sono soggetti ad esporsi a notevoli e bruschi squilibri di temperatura, afferma che pur potendo tali repentini passaggi essere causa di numerosi danni all'organismo, tuttavia riconosce che l'abitudine concede una spiccata impunità.

Azione del caldo.

Minore è il consenso che il caldo, a somiglianza del freddo, possa essere causa predisponente delle malattie polmonari; però alcune esperienze del Gibier e del Maurel, tenderebbero a dimostrare che l'organismo può subire delle alterazioni pressochè uguali a quelle che produce il freddo nei riguardi dello sviluppo delle malattie infettive.

Infatti il Gibier, riscaldando le rane, riuscì a far loro contrarre il carbonchio, similmente a quanto ebbe ad ottenere il Pasteur raffreddando invece i suoi polli. Il Maurel vide in seguito, che sovrariscaldando gli animali, i leucociti di questi venivano a subire delle alterazioni tali, da perdere la loro azioni distruttrice dei germi. Per tali ricerche volli assicurarmi, cogli esperimenti, se il polmone, nel riguardo della difesa contro i germi, risente un danno dell'azione prolungata del caldo non esagerato sull'organismo.

In queste mie esperienze, come per le antecedenti, tenni sempre una parte degli animali per controllo entro il laboratorio, mentre l'altra parte veniva posta in un termostato a 30°-35° C., dopochè tutti gli animali, compresi i controlli, avevano subìto l'innesto polmonare del *B. prodigiosus* al solito modo.

I risultati delle ricerche stanno esposti nella TABELLA IV (*v. a pag. 90 e 91*).

Dall'esame comparativo dei dati esposti in questa tabella, risulta *che l'esposizione continuata delle cavie alla temperatura di 30°-35° non influisce sul potere di difesa del polmone contro i microrganismi; poichè le cifre rappresentanti il numero dei germi trovati nei polmoni degli animali tenuti in termostato, confrontate con quelle degli animali controlli, sono di poco e non costantemente superiori, e non permettono perciò di poter dedurre che un danno il polmone possa aver risentito nella funzione che andiamo studiando.*

Azione del bagno.

Alcuni esperimentatori, come ebbi ad accennare a proposito dell'azione del freddo sull'organismo, nelle loro esperienze usavano raffreddare gli animali tenendoli in bagno a temperature piuttosto basse; e traevano le loro conclusioni sull'azione di quella data temperatura sull'organismo degli animali. Essi con ciò non pensavano, che la capacità termica dell'acqua è assai superiore a quella dell'aria, per cui il bagno ad una data temperatura, esercita sull'organismo modificazioni ben differenti da quelle che eserciterebbe l'aria ad una temperatura anche di molti gradi inferiore.

Fu per tale ragione che nelle mie precedenti ricerche sull'azione del freddo non ho voluto far uso del bagno per raffreddare gli animali, poichè ero sicuro di non ottenere così dei risultati relativi alla temperatura colla quale volevo sperimentare. In appoggio a questo mio modo di vedere, stanno le osservazioni dell'Hayem, il quale ha trovato che si sopportano assai meglio e più lungamente le variazioni di temperature nell'aria che non nell'acqua; e quelle del Vinay, che alla fine delle sue numerose esperienze sui bagni, conclude, che l'ambiente termico dato dall'acqua a + 6° + 12° C., determina dolore e sostanziali modificazioni fisiologiche, mentre l'ambiente termico alla stessa temperatura data dall'aria, viene percepito assai leggermente come freddo, e le modificazioni funzionali e fisiologiche hanno scarsa importanza. Per le temperature più alte, egli vide poi, che l'ambiente termico dato dall'acqua a + 20° C., viene percepito in modo vivissimo come freddo, determinando modificazioni del polso e del respiro, e quelle a + 25° + 32° come fresco, dando pur esso, in grado più mite, modificazioni fisiologiche, mentre che la temperatura dell'aria a + 20° C., viene percepita come calore mite, e quella a + 25° + 32° C., come calore mal sopportato, determinando modificazioni fisiologiche nel senso opposto a quelle provate

coll'acqua alla stessa temperatura. In base a queste considerazioni ho voluto vedere quale influenza abbia il bagno, sia pure ad una temperatura piuttosto alta, sul potere di difesa dei polmoni delle cavie contro i microrganismi, esercitando esso sull'organismo azioni speciali e proprie.

Scelte, come di consueto, cavie della stessa età e presso a poco dello stesso peso, praticavo loro il solito innesto polmonare del *B. prodigiosus*, e quindi divise in due gruppi, uno mi serviva di controllo, l'altro veniva posto nel bagno a + 30° + 35° C. per 20 minuti ogni 12 ore, fino al momento nel quale l'animale veniva ucciso.

Debbo dire subito che le cavie sopportavano male tale bagno, poichè subito dopo questo, rifiutavano il cibo e rimanevano semi-sdraiate, immobili nella gabbia.

Riassumo nella TABELLA V i risultati (*v. a pag. 92 e 93*).

Da tale tabella chiaro appare come il bagno alla temperatura di 30°-35° C. eserciti una influenza dannosa sul potere battericida del polmone, facendo esso ritardare la distruzione dei microrganismi fatti appositamente inalare alle cavie.

Ciò dimostra come il bagno eserciti sull'organismo una azione ben più complessa e qualche volta ben più dannosa dell'ambiente termico dell'aria; poichè mentre nella precedente esperienza gli animali che erano tenuti nell'aria a 30°-35° C. quasi nessuna modificazione hanno presentato riguardo all'argomento che ci occupa, in questi che ebbero a subire il bagno alla stessa temperatura per soli 20 m.′ ogni dodici ore, le modificazioni sono così appariscenti e costanti da non poter su di esse dubitare. E ciò trova la sua spiegazione combinata nel fatto che già a 30°-35° C. l'acqua sottrae calore all'organismo molto più che non l'aria alla stessa temperatura, e nel fatto che il potere battericida del polmone diminuisce, come innanzi risulta allorchè s'avvera un raffreddamento del corpo. Vengono così questi miei risultati a dare un appoggio all'opinione di alcuni idrologi e di molti clinici i quali non consigliano il bagno nelle malattie infettive polmonari.

Azione della fatica.

La fatica se non può dirsi causa diretta di malattie ne è più spesso la causa predisponente, indebolendo l'organismo.

Infatti è comunemente noto per i lavori del Mosso, del Ranke, del Liebig, del Gaucher, del Rummo, del Bordoni, ecc., come la fa-

tica, specie muscolare, dia luogo a svariati prodotti tossici che il Gautier chiamò leucomaine; i quali non danneggiano solo la parte funzionante, ma versandosi nel torrente circolatorio vengono ad alterare tutto l'organismo, danneggiandolo in svariati modi.

La parte che spetta alla stanchezza in rapporto allo sviluppo delle infezioni fu studiata da Charrin e Roger.

Questi autori eperimentarono sui topi bianchi; essi stancavano tali animali facendoli camminare per un tempo piuttosto lungo nel solito tamburo girante, previa inoculazione di alcune goccie di colture attenuate di carbonchio, e tenendo contemporaneamente degli animali di controllo, videro che mentre gli animati affaticati in breve tempo morivano, i controlli resistevano all'infezione carbonchiosa. Gli stessi risultati ebbero per il carbonchio sintomatico, mentre colle colture di carbonchio ematico virulente pur verificandosi la morte anche nei controlli, questa avveniva molto più tardi che negli animali sottoposti alla fatica. Perciò essi vennero alla conclusione che la fatica generale imposta agli animali inoculati sia col carbonchio ematico, sia col sintomatico, favorisce in modo notevole lo sviluppo e la generalizzazione della infezione.

A conclusioni analoghe per altre infezioni vennero pure l'Arloing ed il Thomas i quali similmente ai precedenti autori affermarono che la fatica diminuisce in generale il potere di difesa dell'organismo e favorisce lo sviluppo delle malattie infettive.

Al contrario però il Ceni, che ricercò il potere battericida del sangue delle pecore e dei cani affaticati, ha dimostrato che il potere battericida del sangue varia poco sotto l'influenza della fatica, e che in generale questo potere diminuisce solo nella pecora nella fatica di breve durata, mentre aumenta in essa nella fatica prolungata.

In base a tali esperimenti volli vedere quale influenza esercitasse la fatica muscolare sul polmone sempre nel riguardo del suo potere di difesa contro i microrganismi.

Per tale mia ricerca dopo aver fatto inalare, *more solito*, il *B. prodigiosus* alle cavie, ed avere tenute da parte quelle che mi sarebbero servite di controllo, gli animali da esperimento venivano posti in un tamburo girante che ebbi a far costruire appositamente per tali animali.

Esso tamburo era del diametro di un metro e di larghezza tale da impedire che le cavie potessero mettersi di traverso e quindi rotolare anzichè correre, inoltre, per evitare che gli animali in moto potessero scivolare, feci disporre lungo il *trottoir* del tamburo

tante assicelle poste di traverso in modo da obbligare l'animale a muovere le gambe per avanzare.

Da principio le cavie poco si prestavano ad un tale gioco, ma con un poco di pazienza e girando da prima molto adagio si riesce ad abituarle in tale involontaria corsa.

Gli animali dunque appena polverizzati venivano posti nella ruota nella quale in circa mezza ora, facevo loro percorrere, con qualche breve riposo, mezzo chilometro, dopo di che l'animale, dato il rapporto fra la lunghezza della strada percorsa e la velocità da una parte, e la piccolezza del corpo dall'altra, appariva veramente stanco.

La corsa veniva ripetuta due volte al giorno per ciascun animale fino al momento fissato per l'uccisione. Per il resto procedevo come nelle esperienze precedenti.

Come risulta dalla TABELLA VI (*v. a pag. 94 e 95*) *la fatica muscolare viene a diminuire notevolmente il potere di difesa che oppone il polmone ai microrganismi in esso penetrati.* Infatti dopo 72 ore dalla inalazione del *B. prodigiosus* esso fu riscontrato costantemente nel polmone degli animali in esperimento in quantità notevolmente abbondanti. E confrontando tali cifre con quelle ottenute dall'esame dei polmoni delle cavie controllo, appare che il numero dei *B. prodigiosus* riscontrato dopo 72 ore nei polmoni delle cavie affaticate, si avvicina a quello ritrovato dopo 24 ore negli animali controllo; da ciò un ritardo nella distruzione di ben 48 ore. Per cui col Marfan sono dell'opinione che la fatica, per le modificazioni chimiche che provoca negli organi, venga ad attenuare il potere di difesa dell'organismo, ed in ispecie del polmone contro i microbi; diminuzione che il Marfan dice dovuta alla minore attività dei fagociti, alla diminuita azione chemiotossica delle cellule e funzione battericida ed antitossica degli umori.

Azione dei traumi.

È riconosciuto generalmente come anche i traumi possano predisporre più o meno direttamente alle malattie infettive.

Per quanto riguarda in modo speciale le infezioni polmonari, le numerose osservazioni cliniche fatte su questo argomento dal Litten, dal Murri, dal Paterson, dal Lucatello, dal Mircoli, dal Galluzzi e da altri ancora, stabiliscono come si possano avere, in seguito ad un trama sulla parete toracica, dei processi infettivi polmonari che con tutta probabilità non si sarebbero sviluppati se il trauma non

fosse venuto. In appoggio a tali osservazioni stanno le prove sperimentali dell'Hermann, del Schuller, del Mariani, del Gamaleia.

Quest'ultimo, dopo aver introdotto nella trachea di parecchie pecore il pneumococco, ne sottopose alcune a traumi delle pareti toraciche, ed in molte di queste ebbe lo sviluppo della pneumonite, ciò che non avvenne per gli animali tenuti per controllo.

Egli assieme agli altri autori su citati ritiene che il facile attecchimento e sviluppo dei microrganismi in una regione traumatizzata sia dovuto alle alterazioni degenerative dei tessuti, ai disturbi circolatori ed ai versamenti sanguigni i quali offrono un buon mezzo di nutrizione ai batteri; ciò che concorre a produrre una alterazione della forza di resistenza del polmone contro i microrganismi.

Finora abbiamo veduto che, senza che vi sieno questi disturbi, il potere di difesa del polmone contro i microrganismi in genere viene ad essere modificato da altre cause; ora tale potere vien modificato anche dal trauma non solo nel punto traumatizzato, dove tali disturbi si avverano, ma anche nel resto del polmone dal trauma non direttamente leso?

Le mie esperienze erano condotte nel seguente modo.

Provocavo il trauma nelle cavie in esperimento percuotendo con un martelletto di legno una parte del torace che veniva subito contrassegnata colorando la cute con un colore d'anilina. Nella prima serie producevo agli animali prima il trauma e successivamente facevo loro l'inalazione del *B. prodigiosus.* Nella 2ª serie invece prima praticavo l'innesto polmonare, e subito producevo il trauma.

Gli animali, come al solito, entro periodi di tempo fissati venivano uccisi; e per ciascuno di essi prendevo questa volta in esame non più tre, ma quattro pezzetti di polmone. Il 1° pezzo asportato era quello corrispondente alla regione traumatizzata, che il più delle volte si rintracciava facilmente per un leggiero versamento sanguigno manifesto alla superficie del polmone stesso; quindi toglievo un pezzetto nella regione omologa dell'altro polmone non traumatizzato, e successivamente altri due pezzetti, uno dal polmone che subì il trauma, ma a distanza dal punto leso, l'altro nella regione corrispondente a quello, nel polmone omologo. Altrettanti pezzi venivano asportati dalle regioni corrispondenti negli animali di controllo, e per tutti procedevo alla ricerca quantitativa del *B. prodigiosus.* TABELLE VII e VII *bis* (*v. a pag. 96 e 97, 98 e 99*).

Dalle ricerche su accennate risulta che il trauma, sia esso antecedente o susseguente all'innesto del *B. prodigiosus*, fa sì che que-

st'ultimo si ritrovi sempre nella parte lesa in quantità superiore per un tempo più lungo che nelle altre parti del polmone.

Dallo studio poi attento delle tabelle un altro fatto si rende manifesto, e cioè che quantunque il trauma abbia esercitato la sua azione sopra una piccola parte di un lobo polmonare, tutto il lobo risente un'alterazione nei riguardi del potere distruttivo dei microrganismi in esso penetrati; inquantochè alle cavie n. 165 della 1ª serie ed a quelle n. 171-172 della 2ª serie, alle quali furono asportati oltre ai pezzi di polmone della parte veramente traumatizzata, anche pezzi dello stesso lobo, si è visto come in questi ultimi dopo 48 e dopo 72 ore dall'inalazione esistessero ancora dei bacilli; mentre nei pezzi corrispondenti del polmone dell'altro lato ed in quelli delle cavie controllo, germi più non si riscontravano. Tale alterazione invece non si avvera negli altri lobi e tanto meno nel polmone del lato opposto; giacchè differenze notevoli non si sono avute nell'esame dei vari pezzi di polmone delle altre cavie.

Perciò si potrà conchiudere che, i *traumi della parete toracica non solo fanno diminuire la funzione protettiva contro i microrganismi nella porzione polmonare lesa dal trauma, ma abbassano tale funzione anche in tutto il lobo leso, qualunque sia la parte direttamente traumatizzata.*

Azione delle polveri.

Non entrerò a parlare dell'azione meccanica e chimica che le varie polveri inalate dal polmone vengono ad esercitare su di esso producendo quella notevole serie di malattie che dal semplice catarro bronchiale arriva alla polmonite grave ed all'ascesso polmonare.

Per la natura del mio studio dirò solo come sia cosa nota che in seguito ad inalazione di polveri più facile riesca l'attecchimento dei microrganismi nel polmone ed il successivo sviluppo di malattie infettive, e ciò tanto più, quanto più ledenti sono le polveri inalate.

Infatti l'Arnold, che molto si occupò di tale argomento, trovò che facendo inalare a diversi animali da esperimento varie qualità di polveri, la minore mortalità di essi per pneumonite era data da quelli animali che avevano inspirata la fuliggine, e la massima da quelli che avevano inalato la polvere di smeriglio o di pietra arenaria.

Fatti analoghi furono pure riscontrati dal Villaret, dall'Albrecht,

dal Claissé e Jousué, poichè tutti s'accordarono nell'affermare che le polveri inalate in gran quantità, pur agendo in modo diverso nel polmone, determinano su di esso un'azione irritante che prepara l'organo alle varie malattie infettive non solo, ma ne rende il decorso più grave per le lesioni che al tessuto polmonare le polveri vengono a produrre.

Volli anche a questo proposito vedere, entro quali limiti viene a modificarsi il potere di difesa del polmone contro i microrganismi in seguito all'inalazione di varie qualità di polveri, indipendentemente dalle lesioni anatomiche del polmone stesso.

Per le esperienze scelsi due tipi di polvere, uno tra quelle che ledono in minor grado gli organi respiratori (polvere di licopodio); l'altro, tra quelle invece che ledono in maggior grado (polvere di smeriglio).

Facevo inalare queste polveri a due differenti gruppi di cavie entro cassette speciali, mercè polverizzatori, per due ore di seguito, due volte al giorno, per la durata di un mese; alla fine del quale facevo alle stesse inalare il *B. prodigiosus*, e tenendone altre per controllo, procedevo come per le antecedenti esperienze.

Nelle tabelle riassuntive i risultati dei controlli sono ripetuti, essendomi servito degli stessi per tutti due i gruppi degli animali sottoposti all'inalazione delle differenti polveri, avendo essi tutti assieme subìto l'innesto del *B. prodigiosus* nello stesso tempo. TABELLA VIII (*v. a pag. 100 e 101*).

Da queste ricerche risulta che mentre la polvere di licopodio, inspirata in notevole quantità dalle cavie, esercita nel loro polmone un'azione nociva sul potere distruttivo dei microrganismi, per quanto poco sensibile, la polvere di smeriglio lo danneggia invece notevolmente. E se a questa maggiore influenza nociva devono naturalmente molto contribuire le lesioni anatomiche causate dalla durezza ed angolosità dello smeriglio, il risultato ottenuto colla polvere di licopodio autorizza a ritenere che, indipendentemente dalle lesioni, una diminuzione del potere battericida del polmone deve essersi anche verificata.

Azione dell'alcool.

La recente campagna che si muove non solo all'abuso ma anche all'uso dell'alcool da parte di molte associazioni antialcooliste, tanto che per esse l'alcool dovrebbe assolutamente essere sottratto dal consumo quale bevanda, mi ha indotto a ricercare se una tale so-

stanza, come in genere si crede, eserciti un'azione veramente nociva sulla difesa del polmone.

Infatti osservazioni cliniche tendono a dimostrare come l'alcoolismo abbia un'azione preponderante nella genesi delle malattie infettive polmonari, e tutti gli autori che ebbero a trattare l'argomento da Magnus-Huss, a Founier, a Lanceraux, a Massalongo, a Wesener, per citarne solo qualcuno, sono concordi nell'affermare che l'alcoolismo favorisce lo sviluppo delle malattie del polmone.

Negli ultimi tempi numerose furono le esperienze fatte per studiare l'azione dell'alcool in rapporto allo sviluppo delle malattie infettive e varie sono le opinioni in proposito; alcuni cioè trovarono che l'introduzione dell'alcool nell'organismo ne favorisce lo sviluppo, altri vedono in esso un nemico dell'infezione.

L'Abbott introduceva nello stomaco dei conigli da 5 a 15 cmc. di alcool per la durata di 114 giorni, dopo di che, come egli scrive, le mucose apparivano infiammate ed erose. Quindi egli infettava sotto cute gli animali collo streptococco piogeno, o collo stafilococco piogeno, e trovava una diminuzione di resistenza contro l'infezione da parte di questi animali in confronto dei controlli.

Da ciò egli concluse che l'uso prolungato dell'alcool agisce determinando un indebolimento sulla naturale difesa dell'organismo alle malattie infettive.

Il Laitinen dopo aver alcoolizzati gli animali per settimane e mesi ed aver loro inoculato parecchie varietà di germi patogeni, vide che gli animali trattati con l'alcool morivano, mentre i controlli sopravvivevano o soccombevano molto più tardi.

Il Gruber pure, in seguito alle sue esperienze, è dell'opinione che negli animali alcoolizzati si abbia un aumento della sensibilità alle infezioni, come anche nelle intossicazioni con tossici batterici.

In fine il Kögler trovò pur esso una diminuzione della resistenza delle cavie alcoolizzate di fronte al pneumococco.

In contraddizione, forse apparente, e ne vedremo la probabile ragione, stanno invece le osservazioni dei qui sotto enunciati esperimentatori.

Il Mircoli dimostrò che il siero di sangue di uomini che facevano frequente uso di alcool, senza essere malati di alcoolismo, possedeva il potere di neutralizzare l'avvelenamento da tubercolina in maniera molto più spiccata di quanto possa fare il siero di sangue di un uomo sano e robusto. Assieme al Gervino, negli animali abituati a nutrirsi con l'alcool egli trovava inoltre l'aumento di resistenza di fronte all'infezione tubercolare.

In altra serie di ricerche simili, ambedue gli sperimentatori trovarono ancora che il siero di sangue del coniglio alcoolizzato, veniva a possedere energico potere battericida per il B. del tifo al confronto del siero di sangue di un coniglio controllo; e che in tutto l'organismo si aveva un aumento del potere di reagire e di resistere dei tessuti verso una determinata infezione (tubercolosi); onde essi sono del parere che l'alcool, oltre a qualunque azione diretta che possa esercitare sui germi eciti l'organismo ad elaborare più numerose e valide alessine batteriche.

E' indiscutibile, essi dicono infine, come la sottrazione dell'alcool in persone abituate riesca cosa pericolosa quando sieno colpite da infezioni (polmonite, tifo).

Il Friedberger considerando che durante le epidemie i bevitori soggiacciono più facilmente alle infezioni, mentre d'altra parte l'alcool viene da molti considerato come un rimedio molto attivo, ha voluto indagare in qual modo esso agisca somministrato per una volta tanto, o molto tempo di seguito. Egli esperimentò col vibrione del colera. Prima inoculava per lungo tempo dell'alcool a dei conigli, ad altri invece somministrava solo una dose al momento dell'infezione; infettava quindi tutti assieme gli animali, trovando che quelli che erano stati trattati lungamente con alcool producevano 16 volte meno sostanze protettrici verso il colera che gli animali controllo; mentre quelli inoculati con alcool una sola volta davano alla stessa infezione un aumento notevole delle sostanze protettive.

Fränkel, lo scorso anno, ripetendo le prove del Friedberger, trovò che gli animali trattati con una semplice dose di alcool si mostravano 5-10 volte più resistenti di quanto non si mostrassero quelli che ne facevano uso da lungo tempo; però egli osservò ancora che se questi ultimi venivano infettati gradatamente allora riscontrava in essi un potere immunizzante maggiore.

Le esperienze da me fatte per la ricerca delle modificazioni che eventualmente avrebbe subìto il potere di difesa dei polmoni contro i microrganismi in seguito alle inoculazioni di alcool, furono divise in tre gruppi.

Agli animali del 1° gruppo veniva prima fatto l'innesto polmonare del *B. prodigiosus* e subito dopo inoculato sotto cute a ciascun di essi da 1, 5 a 2 cc. di soluzione acquosa di alcool a 45 % ogni 12 ore sino al momento dell'uccisione.

Gli animali del 2° e 3° gruppo venivano invece un mese e mezzo prima dell' innesto alcoolizzati iniettando ad essi ogni giorno 1, 5 a 2 cc. della soluzione di alcool su accennata; dopo il qual tempo facevo inalare, al solito modo, il *B. prodigiosus*. A quelli del 2° gruppo continuava le inoculazioni di alcool anche dopo l'innesto; mentre le sospendevo a quelli del 3° gruppo. Per tutto il resto ho usata la tecnica descritta nei capitoli precedenti.

Dirò qui che gli animali del 2° e 3° gruppo si presentavano dopo parecchie inoculazioni di alcool più svogliati e meno avidi del cibo che gli altri.

I risultati dalle esperienze stanno esposti nelle TABELLE IX e X.

Dall'esame comparato (*v. a pag. 102 e 103, 104 e 105*) delle tabelle suddette appare:

I. Che negli animali che furono trattati coll' alcool, solo dopo l'innesto polmonare del *B. prodigiosus*, si ebbe un aumento notevole del potere distruttivo dei microrganismi da parte del polmone,

perchè dopo 24 ore dall'innesto gli stessi germi sono quasi tutti scomparsi dal polmone, mentre nei controlli tale numero dopo tale periodo è ancora notevolmente superiore.

II Che negli animali che fecero uso dell'alcool per un tempo piuttosto lungo prima dell'innesto sperimentale dei bacilli, ma che continuarono a prendere l'alcool anche dopo di esso, il numero dei *B. prodigiosus* riscontrati nei loro polmoni al confronto dei controlli fu pressochè eguale o di poco superiore.

III. Che negli animali che furono come i precedenti per egual tempo trattati coll'alcool, ma dopo l'innesto del *B. prodigiosus* fu a loro sospesa la somministrazione dell'alcool stesso, si ebbe a riscontrare nei loro polmoni un numero maggiore di *B. prodigiosus* al confronto dei controlli, ed un aumento nel tempo impiegato per la completa distruzione.

Perciò si deve concludere che *la somministrazione di alcool in animali ad esso non abituati, o per dir meglio che dall'alcool non hanno ricevuto nocumento, ha per effetto un aumento del potere di difesa del polmone contro i microrganismi penetrativi. Negli animali invece che furono sottoposti alle iniezioni continuate di alcool, tale potere appare di poco modificato in quelli che continuarono a prenderlo anche dopo la penetrazione dei germi, mentre esso diminuisce notevolmente in quelli ai quali l'alcool bruscamente fu tolto.*

Un' interpretazione ragionevole dei fatti sopra esposti sembrami debba trovarsi sia nel riconoscere all'alcool, con gli autori innanzi ricordati, un'azione eccitante sul potere di difesa del polmone, e sia nel fatto che l'alcool è dotato anche di un potere microbicida, onde venendo esso eliminato in parte per il polmone, non è improbabile che possa esercitare in quest' organo anche un' azione deleteria diretta, sui microrganismi che vi si trovano.

E anche se nella dose, colla quale l'alcool ingerito si elimina pel polmone, esso non possa raggiungere una vera azione disinfettante, la sua azione antisettica è già sufficiente per mettere i microrganismi in condizioni di maggiore inferiorità verso il potere battericida naturale dell'ambiente polmonare. Ciò pel primo caso.

Per gli altri due invece si ha che per l'eccessivo e prolungato uso dell'alcool, deriva una diminuzione del potere microbicida del polmone, resa tanto più evidente, se colla sottrazione dell' alcool viene, fra l'altro, a mancare quell' azione antisettica che abbiamo detto poter essere esercitata dalle dosi di alcool che pel polmone si eliminano.

***

Giunto così alla fine delle ricerche ne riassumo brevemente i risultati principali.

I. Il polmone sano degli animali esperimentati tenuti in condizioni normali possiede un energico potere distruttivo dei microrganismi in esso penetrati.

II. L'esposizione prolungata degli animali al freddo, le rapide oscillazioni di temperatura (0° + 30° C.), il bagno, anche a temperatura relativamente alta (+ 30° C.), la fatica muscolare, i traumi, le inalazioni di polveri, specie se dure, determinano delle modificazioni tali da far diminuire quel potere naturale di difesa del quale il polmone è normalmente provveduto.

III. L'esposizione prolungata al caldo (+ 30°-35° C.) non modifica tale funzione del polmone.

IV. L'alcool somministrato in dose non venefica, a soggetti non alcoolizzati, fa aumentare la funzione protettrice del polmone contro i microrganismi; mentre lo mantiene presso a poco normale nei soggetti alcoolizzati da tempo, ai quali si continui la somministrazione moderata di alcool durante e dopo la penetrazione dei germi nel polmone, e la indebolisce in modo notevole se sottratto rapidamente a soggetti che erano abituati ad ingerirlo.

Con ciò non intendo di applicare direttamente all'uomo i risultati delle mie esperienze fatte sugli animali, la qual cosa sarebbe prematura e non giustificata, poichè ben diverse sono le condizioni dell'esperimento da quelle della clinica umana. Però non può non darsi ad esse un certo valore anche sotto questo riguardo, visto che alcuni risultati rilevati più sopra coincidono già con osservazioni cliniche eseguite al proposito e dànno una plausibile spiegazione di un bel numero di fatti che la vecchia pratica medica ha sempre osservato.

BIBLIOGRAFIA.

ARNOLD. *Untersuchungen über Staubinhalation und Staubmetastasen.* Leipzig, 1885.

ARLOING. *Surmenage des animaux.* Dict. encyclopédique des sciences médicales, 1884.

ABBOTT. *The influence of acute alcoholism on the normal vital Resistance of Rabbits to infection.* The Journal of Esperimental Med., V. I., 1896, ed Hygien. Rundschau, V. VII, 1897.

BERTARELLI. *Ricerche ed osservazioni sulla biologia e sulla patogeneità del bacillo prodigioso.* Archivio per le scienze mediche, V. XXVII, 1903.

BARTHEL. *Ueber den Bakteriengehalt der Luftwege.* Centralblatt f. Bakteriologie. V. XXIV, 1898.

BONI. *Untersuchungen über den Keimgehalt der normalen Lungen.* Deutsches Archiv für Klin. Medicin. V. LXIX, 1901.

BUCHNER. *Untersuchungen über den Durchtritt von Infectionserregern durch die intacte Lungenberfläche.* Archiv. für. Hygiene. V. VIII, 1888.

BABES e BECO citati da Quensel (vedi Quensel).

BUCHNER. *Einfacher Zerstäubungsapparat zu Inhalationsversuchen.* Centralblatt für Bakteriologie. V. VI, 1889.

BOUCHARD. Trattato di Medicina. Charcot e Bouchard, trad. ital. Torino, 1892.

CHARRIN e ROGER. *La fatigue et les maladies michrobiennes.* Semaine Médic,. 1890.

CHARRIN. *Patologia generale delle infezioni.* Trattato di Medicina. Charcot e Bouchard. V. I, trad. ital., Torino, 1892.

CENI. *Du pouvoir bactéricide du sang dans la fatigue musculaire.* Archives italiennes de biologie, V. XIX.

CLAISSÉ et JOSUÉ. *Les pneumoconioses.* Bulletin de l'Académie de médecine, 1897, et Revue d'Hygiène et P. S. 1897.

DÜRCH. *Aetiologie und Histologie der Pneumonie in Kindesalter und der Pneumonie in Allgemeinen* Deutsches Archiv. fur Klin. Medicin. V. LVIII.

ERNST. Ziegler's Beiträge zur path. Anat. V. VIII.

FLÜGGE. *Ueber Luftinfection.* Zeitschrift für Hygiene und Infectionskrankheiten. V. XXV, 1897.

FLEINER. *Ueber die Resorption corpuscul. Elemente durch Lunge und Pleura.* Virchow's Arch. V. CXII, 1888.

FLECK. *Die acute Entzündung der Lunge.* Diss. Bonn., 1886.

FILEHNE. *On the Action of Heat and Cold on Erysipelas.* Proceedings of the Physiological Society, 1894. The Journal of Physiology, V. XVII, 1894-95.

FOURNIER. *Alcoolisme.* Nouveau dictionnaire de Méd. et Chirurg. pratiques, Paris.

FRIEDBERGER. *Alkohol und Infectionkrankheiten.* Deuts. Med. Wochenschrift, 1904 e Gazzetta degli Ospedali e Cliniche, 1904.

FRÄNKEL. *Immunität wegen Alkohol.* Berlin. Klinische Wochenschrift, 1905.

GÖBELL *Ueber die Infection der Lungen von den Luftwegen*, aus Dissertation. Marburg, 1897.

GIBIER citato dal Charrin, (vedi Charrin).

GALLUZZI. *Contributo clinico allo studio della polmonite traumatica fibrinosa.* Gazzetta degli Ospedali e delle Cliniche, 1906.

GAMALEIA. *Etiologie de la pneumonie fibrinose.* Annales de l'Institut Pasteur, 1888.

GRUBER. *Der Einfluss des Alkohols auf den Verlauf der Infectionskrankheiten.* Wiener med. Wochenschrift, 1901, ed Hygienische Rundschau, 1902.

HILDEBRANDT. *Experimentelle Untersuchungen über das Eindringen pathogener Mikrorganismen von den Luftwegen und Lungen*, aus Beiträge patholog. Anatomie. Von Ziegler, ref. in Centralblatt f. Bakteriologie. V. IV.

HEIDENHAIM e HOFBAUER citati da Kisskalt (vedi Kisskalt).

HAMBURGER. *Ueber den Einfluss von Köhlensaüre br. w. von Alkal, etc.* Virchow 's Archiv. V. CLVI, Heft. 2.

HAYEM. Leçons de Thérapeutique, Paris 1894.

HERMANN. *Influence des variations der terrain organique sur les microbes pyogénes.* Annales de l'Institut Pasteur, 1891.

KLIPSTEIN. *Experimentelle Beiträge zur Frage der Beziehungen zwischen Bakterien und Erkrankungen der Athmungsorgane.* Zeitschrift für Klin. Medicin. V. XXXIV.

KOENIGER. Untersuchungen über die Frage der Tropfcheninfection. Ebenda. V. XXXIV.

KISSKALT. *Die Erkältung als Krankheitsdisponirendes Moment.* Archiv. für Hygiene. V. XXXIX, 1901.

KÖGLER citato dal Gruber (vedi Gruber).

INS-VON. *Experimentelle Untersuchungen über Kieselstaubinhalation.* Archiv f. exper. Pathol. 1876 e Virkw 's Archiv. LXXIII, 1878.

LAEHR. *Ueber den Untergang des Staphylococcus pyogenes aureus in den durch ihn hervorgerufenen Entzündungsprocessen d. Lunge.* Diss. Bonn., 1887.

LIPARI. *Contributo sperimentale alla natura infettiva della pneumonite fibrinosa.* Il Morgagni, 1888.

LODE. *Ueber die Beeinflussung der individuellen Disposition zu Infectionskrankheiten durch Warmeentziehung.* Archiv. für Hygiene V. XXVIII.

LIEBERMEISTER. Handbuch der Pathologie und Therapie des Fiebers. Leipzig, 1875.

LITTEN. *Ueber die durch Contusion erzengten Erkrankungen des Brustorgans mit besonderer Berucksichtingung der Contusions, pneumonien.* Zeitschr. für Klin. Med., V. V.

LUCATELLO. Congresso di Medicina interna. 1890.

LANCEREAUX. *Alcoolisme.* Dictionaire Encyclopédique des sciences médicales. Paris.

LAITINEN. *Ueber des Einfluss des Alkohols auf die Enpfindlichkeit des thierischen Körpers für Infektionsstoffe.* Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten. V. XXXIV.

MUSKATBLUTH. Citato da Tchistovitch. (Vedi Tchistovitch).

MASSALONGO. Patologia della pneumonite acuta. Verona, 1889.

MAUREL. Citato da Bouchard. (Vedi Bouchard).

MARFAN. *La fatigue et le surmenage.* Traité de Pathologie générale par Bouchard. V. I. Paris, 1895.

MURRI. *Di una perizia per pneumonite contusiva.* Rivista sperimentale di Freniatria e Medicina legale. 1888.

MIRCOLI. *Ricerche sperimentali e cliniche sulle polmoniti traumatiche.* La Clinica Medica Italiana. 1898.

MAGNUS HUSS. *Der alkoholismus.* Berlin, 1868.

MIRCOLI e GERVINO. *Di alcune basi scientifiche del valore curativo dell'alcool.* Gazzetta degli Ospedali e delle Cliniche. V. XXIV. 1903.

MIRCOLI e GERVINO. *Antoemolisi da alcool.* Gazzetta degli Ospedali e delle Cliniche. V. XXIV. 1903.

MIRCOLI e GERVINO. *Significato immunizzante delle antoemolisi da alcool.* Gazzetta degli Ospedali e delle Cliniche. V. XXIV. 1903.

MIRCOLI. *Le basi scientifiche del valore terapeutico dell'alcool.* La Clinica Medica Italiana. 1905.

NEISSER. Citato dal Quensel. (Vedi Quensel).

NENNINGER. *Ueber das Eindringen von Tropfchen und Staub.* Zeitschrift für Hygiene und Infectionskrankheiten V. VXXXVIII. 1901.

PAUL. *Ueber die Bedingungen des Eindringens Bakterien der Inspirationsluft in die Lungen.* Zeitschrift für Hygiene und Infectionskrankheiten. V. XL. 1902.

PIERACCINI. *Patologia del lavoro e terapia sociale.* Milano, 1906.

PATERSON. *Pneumonia after external Violence.* The Lancet V. I. 1894.

PASTEUR. Bullet. de l'Académie de médecine. V. LXXVIII.

QUENSEL. *Untersuchungen über das Vorkommen von Bakterien in den Lungen und bronchialen Lymphdrüsen gesuader Thiere.* Zeitschrift für Hygiene und Infectionskrankheiten. V. XL. 1902.

RUPPERT. *Exper. Untersuch. über Kohlenstaubinhalation.* Virchow's Arch. V. LXXII. 1877.

RIBBERT. *Der Untergang pathogener Schimmelpilze in Körper.* Bonn, 1887.

RUHEMANN. Citato da Strasser. (Vedi Strasser).

RONZANI. *Azione della polvere di carbone sui microrganismi con speciale riguardo allo sviluppo della tubercolosi nei polmoni antracotici.* Annali d'Igiene Sperimentale. 1905.

SLAWJANSKY. *Experimentelle Beitrage zur Pnenmoconiosis Lehre* Virchow's Arch. V. XLVIII.

Schottelius. *Experim. Unters. über die Wirkung inhalirter Substanzen.* Wirchow's Arch. V. LXXIII.

Sawtschenko. *Zur Frage über die Immunität gegen Milzbrand.* Centralblatt für Bakter. V. IX. 1891.

Strasser. *La Clinica contemporanea.* Leyden e Klemperer. V. I. Milano, 1905.

Tchistovitch. *Des phénomènes de phagocytose dans les poumons.* Annales de l' Institut Pasteur. 1889.

Vinay. *L' idroterapia.* Milano 1902.

Villaret. *Gesundheitschädigente Einflüsse beim Gewerbebettriebe.* Dall' Handbuch der Praktischen Gewerbehygiene dell'Albrecht. Berlin, 1896.

Wisokowier. Citato dal Quensel. (Vedi Quensel).

Wagner. *Zur Lehre von der Bedeutung der Temperature bei den Infectionen.* Wratsch. 1890. ref. Centralblatt f. Bakteriol. V. IX. 1891.

Wesener. *Zur Alkoholfrage. Flade.* Hygienische Rundschau. V. VII. 1897.

TABELLA I.

Potere di difesa del polmone di cavie sane in condizioni normali d'ambiente.

Animali in esperimento	Tempo trascorso tra l'inalazione del B. prodigioso e la ricerca dello stesso	Parti del polmone prese in esame — Apice polmone destro			A ½ del lobo inferiore destro con grosso bronco			Base polmone sinistro			Numero medio di B. prodigioso trovato per cmc. di polmone
		Volume esaminato in cmc.	Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	Volume esaminato in cmc.	Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	Volume esaminato in cmc.	Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	
					Esperienza Iª — 26 dicembre 1905.						
Cavia n. 1. .	Subito dopo l'inalazione	0.1	1804	18040	0.2	5016	25080	0.3	5510	18366	20495
» » 2. .	ore 4. . . .	0.2	148	740	0.3	3588	11960	0.3	2220	7400	6700
» » 3. .	» 8. . . .	0.2	90	450	0.3	720	2400	0.2	70	350	1061
» » 4. .	» 12. . . .	0.3	88	293	0.4	42	105	0.4	91	227	208
» » 5. .	» 12. . . .	0.2	43	215	0.3	116	386	0.2	54	270	290
» » 6. .	» 16. . . .	0.1½	25	166	0.2	20	100	0.2	54	270	178
» » 7. .	» 28. . . .	0.2	15	75	0.4	80	200	0.3	50	166	148
» » 8. .	» 28. . . .	0.3	25	83	0.3	36	120	0.3	40	133	112
» » 9. .	» 32. . . .	0.2	12	60	0.3	30	100	0.4	35	87	82
» » 10. .	» 36. . . .	0.2	4	20	0.4	18	45	0.3	9	30	31
» » 11. .	» 40. . . .	0.1	0	0	0.4	12	30	0.3	2	6	12
» » 12. .	» 44. . . .	0.2	0	0	0.3	4	13	0.4	1	2	5
» » 13. .	» 48. . . .	0.3	0	0	0.4	0	0	0.3	0	0	^
» » 14. .	» 48. . . .	0.3	0	0	0.5	0	0	0.2½	0	0	0
					Esperienza IIª — 10 gennaio 1906.						
Cavia n. 15. .	Subito dopo l'inalazione	0.2	3010	15050	0.3	8025	26750	0.2	3190	15950	1925
» » 16. .	» »	0.1½	2115	14100	0.2	7200	36000	0.4	4910	12270	20788
» » 17. .	ore 6. . . .	0.1	68	680	0.2	462	2310	0.2½	184	736	1242
» » 18. .	» 6. . . .	0.2	102	502	0.4	694	1735	0.2	124	620	952
» » 19. .	» 12. . . .	0.2	75	375	0.3	87	290	0.3	125	416	360
» » 20. .	» 12. . . .	0.1	25	250	0.2½	78	312	0.2	94	470	344
» » 21. .	» 24. . . .	0.1	9	90	0.3	23	76	0.2	31	155	107
» » 22. .	» 24. . . .	0.2	22	110	0.2	30	150	0.4	34	85	115
» » 23. .	» 36. . . .	0.2	5	25	0.3	12	40	0.3	20	66	43
» » 24. .	» 36. . . .	0.1	3	30	0.2½	5	20	0.2	5	25	25
» » 25. .	» 48. . . .	0.2	0	0	0.3	0	0	0.4	0	0	0
» » 26. .	» 48. . . .	0.1½	0	0	0.3	0	0	0.2½	0	0	0
» » 27. .	» 60. . . .	0.2	0	0	0.4	0	0	0.3	0	0	0
» » 28. .	» 60. . . .	0.2½	0	0	0.3	0	0	0.2	0	0	0

TABELLA II.

Animali controlli.

Animali in esperimento	Tempo trascorso tra l'inalazione del B. prodigioso e la ricerca dello stesso	Parti del polmone prese in esame: Apice polmone destro — Volume esaminato in cmc.	Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	A ½ del lobo inferiore destro con grosso bronco — Volume esaminato in cmc.	Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	Base polmone sinistro — Volume esaminato in cmc.	Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	Numero medio di B. prodigioso trovato per cmc. di polmone
					Iª *Serie — 17 gennaio 1906.*						
Cavia n. 29. .	subito dopo l'inalazione	0.2	2500	12500	0.3	6022	20070	0.3	4564	15210	15926
» » 30. .	ore 12. . . .	0.1	42	420	0.2½	66	264	0.3	90	300	328
» » 31. .	» 24. . . .	0.2	12	60	0.3	6	20	0.3	8	25	35
» » 32. .	» 36. . . .	0.1½	1	7	0.4	10	25	0.3	11	35	22
» » 33. .	» 48 . . .	0.2	0	0	0.5	0	0	0.2½	0	0	0
» » 34. .	» 60. . . .	0.2	0	0	0.4	0	0	0.4	0	0	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
					IIª *Serie — 23 gennaio 1906.*						
Cavia n. 41. .	subito dopo l'inalazione	0.1	502	5020	0.2	4886	24430	0.2	3050	15250	14892
» » 42. .	ore 12. . . .	0.3	88	293	0.2½	44	176	0.2	60	300	256
» » 43. .	» 24. . . .	0.2	0	0	0.4	8	20	0.3	6	20	13
» » 44. .	» 48. . . .	0.2	0	0	0.4	0	0	0.3	0	0	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
					IIIª *Serie — 27 gennaio 1906.*						
Cavia n. 51. .	subito dopo l'inalazione	0.1	922	9220	0.2	6402	32010	0.3	2330	7760	16730
» » 52. .	ore 12. . . .	0.1	22	220	0.2	54	270	0.2½	50	200	230
» » 53. .	» 24. . . .	0.2	6	30	0.3	15	50	0.4	32	180	53
» » 54. .	» 48. . . .	0.2	0	0	0.2	2	10	0.5	0	0	3
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

freddo.

Animali esposti al freddo (— 1° + 5° C.).

Animali in esperimento	Tempo trascorso tra l'inalazione del B. prodigioso e la ricerca dello stesso	Parti del polmone prese in esame — Apice polmone destro: Volume esaminato in cmc.	Apice polmone destro: Numero di colonie di B. prodigioso contate	Apice polmone destro: Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	A ½ del lobo inferiore destro con grosso bronco: Volume esaminato in cmc.	A ½ del lobo inferiore destro con grosso bronco: Numero di colonie di B. prodigioso contate	A ½ del lobo inferiore destro con grosso bronco: Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	Base polmone sinistro: Volume esaminato in cmc.	Base polmone sinistro: Numero di colonie di B. prodigioso contate	Base polmone sinistro: Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	Numero medio di B. prodigioso trovato per cmc. di polmone
				Iª Serie — 17 gennaio 1906.							
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Cavia n. 35. .	ore 12. . . .	0.1	61	610	0.2	520	2600	0.2½	120	480	1230
» » 36. .	» 24. . . .	0.2½	16	120	0.5	35	70	0.3	36	120	110
» » 37. .	» 36. . . .	0.2	10	50	0.4	41	100	0.3	13	40	63
» » 38. .	» 48. . . .	0.2	6	30	0.6	30	50	0.3	35	120	67
» » 39. .	» 60. . . .	0.3	9	30	0.4	28	70	0.3	24	80	60
» » 40. .	» 72. . . .	0.2	2	10	0.5	25	50	0.4	24	60	40
				IIª Serie — 23 gennaio 1906.							
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Cavia n. 45. .	ore 12. . . .	0.2	82	410	0.5	616	1232	0.2½	230	920	854
» » 46. .	» 24. . . .	0.2	18	90	0.3	11	36	0.3	140	460	195
» » 47. .	» 48. . . .	0.1½	10	70	0.4	22	52	0.2	4	20	47
» » 48. .	» 60. . . .	0.2	12	60	0.4	20	50	0.3	10	32	47
» » 49. .	» 72. . . .	0.2	0	0	0.4	0	0	0.4	2	5	1
» » 50. .	» 84. . . .	0.3	0	0	0.3	0	0	0.4	0	0	0
				IIIª Serie — 27 gennaio 1906.							
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Cavia n. 55. .	ore 12. . . .	0.2	40	200	0.2½	482	1928	0.2	700	3500	1876
» » 56. .	» 24. . . .	0.2	12	60	0.4	46	110	0.3	73	140	103
» » 57. .	» 48. . . .	0.2	10	50	0.3	28	90	0.4	21	50	63
» » 58. .	» 60. . . .	0.1	0	0	0.5	22	44	0.3	19	60	34
» » 59. .	» 72. . . .	0.3	2	7	0.3	3	10	0.4	2	5	7
» » 60. .	» 84. . . .	0.2	0	0	0.4	0	0	0.5	0	0	0

TABELLA III.

Animali controlli.

Animali in esperimento	Tempo trascorso tra l'inalazione del B. prodigioso e la ricerca dello stesso	Parti del polmone prese in esame: Apice polmone destro — Volume esaminato in cmc.	Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	A ½ del lobo inferiore destro con grosso bronco — Volume esaminato in cmc.	Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	Base polmone sinistro — Volume esaminato in cmc.	Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	Numero medio di B. prodigioso trovato per cmc. di polmone
				Iª Serie — 22 febbraio 1906.							
Cavia n. 61. .	ore 12. . . .	0.1½	93	620	0.4	501	1252	0.3	137	456	776
» » 62. .	» 24. . . .	0.1½	20	132	0.4	127	317	0.2	6	30	159
» » 63. .	» 48. . . .	0.2	0	0	0.4	0	0	0.2	0	0	0
» » 64. .	» 60. . . .	0.1½	0	0	0.5	0	0	0.3	0	0	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
				IIª Serie — 5 marzo 1906.							
Cavia n. 70. .	ore 12. . . .	0.1	48	480	0.4	435	1087	0.2½	50	200	589
» » 71. .	» 24. . . .	0.1½	15	100	0.4½	62	136	0.2½	48	192	142
» » 72. .	» 48. . . .	0.1½	0	0	0.4	2	5	0.3	0	0	1
» » 73. .	» 60. . . .	0.2	0	0	0.4	0	0	0.2½	0	0	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
				IIIª Serie — 12 marzo 1906.							
Cavia n. 79. .	ore 12. . . .	0.1	20	200	0.4	708	1770	0.2½	163	652	874
» » 80. .	» 24. . . .	0.2	22	110	0.4	98	245	0.2	54	270	208
» » 81. .	» 48. . . .	0.1½	0	0	0.3½	0	0	0.2½	0	0	0
» » 82. .	» 60. . . .	0.1½	0	0	0.4	0	0	0.3	0	0	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

passaggi di temperatura.

Animali sottoposti ai bruschi passaggi di temperatura (da + 30°. 35° a 0° + 1° C.).

Animali in esperimento	Tempo trascorso tra l'inalazione del B. prodigioso e la ricerca dello stesso	Parti del polmone prese in esame — Apice polmone destro — Volume esaminato in cmc.	Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	A ¼ del lobo inferiore destro con grosso bronco — Volume esaminato in cmc.	Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	Base polmone sinistro — Volume esaminato in cmc.	Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	Numero medio di B. prodigioso trovato per cmc. di polmone
				Iª Serie — 22 febbraio 1906.							
Cavia n. 65. .	ore 12. . . .	0.2	324	1620	0.4	1788	4470	0.3	912	3040	3043
» » 66. .	» 24. . . .	0.2	35	175	0.4	307	767	0.2	118	590	510
» » 67. .	» 48. . . .	0.1½	0	0	0.4	185	465	0.3	5	16	160
» » 68. .	» 60. . . .	0.1½	0	0	0.4	10	25	0.3	0	0	8
» » 69. .	» 72. . . .	0.2	0	0	0.5	0	0	0.2½	0	0	0
				IIª Serie — 5 marzo 1906.							
Cavia n. 74. .	ore 12. . . .	0.2	340	1700	0.4	790	1985	0.2½	300	1200	1628
» » 75. .	» 24. . . .	0.1½	18	120	0.4	146	365	0.3	138	460	315
» » 76. .	» 48. . . .	0.2	1	5	0.4	43	107	0.2½	10	40	50
» » 77. .	» 60. . . .	0.2½	10	40	0.3	11	36	0.2½	0	0	25
» » 78. .	» 72. . . .	0.1½	0	0	0.4	0	0	0.3	0	0	0
				IIIª Serie — 12 marzo 1906.							
Cavia n. 83. .	ore 12. . . .	0.2	280	1400	0.3	1004	3346	0.2½	512	2048	2264
» » 84. .	» 24. . . .	0.1	18	180	0.4	362	905	0.2	90	450	511
» » 85. .	» 48. . . .	0.1½	11	72	0.4	38	95	0.3	41	136	101
» » 86. .	» 60. . . .	0.1	6	60	0.3	8	25	0.2½	2	8	31
» » 87. .	» 72. . . .	0.1½	0	0	0.4	1	2	0.2½	0	0	1

TABELLA IV.

Animali controlli.

Animali in esperimento	Tempo trascorso tra l'inalazione del B. prodigioso e la ricerca dello stesso	Parti del polmone prese in esame: Apice polmone destro — Volume esaminato in cmc.	Apice polmone destro — Numero di colonie di B. prodigioso contate	Apice polmone destro — Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	A ½ del lobo inferiore destro con grosso bronco — Volume esaminato in cmc.	A ½ del lobo inferiore destro con grosso bronco — Numero di colonie di B. prodigioso contate	A ½ del lobo inferiore destro con grosso bronco — Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	Base polmone sinistro — Volume esaminato in cmc.	Base polmone sinistro — Numero di colonie di B. prodigioso contate	Base polmone sinistro — Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	Numero medio di B. prodigioso trovato per cmc. di polmone
Iª Serie — 31 gennaio 1906.											
Cavia n. 88. .	ore 12. . . .	0.1½	192	1280	0.4	500	1250	0.3	235	750	109
» » 89. .	» 24. . . .	0.1½	10	66	0.5	17	34	0.3	10	33	44
» » 90. .	» 48. . . .	0.2	0	0	0.3	7	23	0.2	0	0	7
» » 91. .	» 60. . . .	0.2	0	0	0.4	0	0	0.3	0	0	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
IIª Serie — 12 febbraio 1906.											
Cavia n. 97. .	ore 12. . . .	0.1	100	1000	0.3	257	856	0.3	182	660	838
» » 98. .	» 24. . . .	0.1½	2	20	0.4	50	125	0.3	16	53	66
» » 99. .	» 48. . . .	0.2	0	0	0.4	0	0	0.2½	0	0	0
» » 100. .	» 60. . . .	0.2	0	0	0.4	0	0	0.3	0	0	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
IIIª Serie — 22 febbraio 1906.											
Cavia n. 106. .	ore 12. . . .	0.1½	196	1300	0.4	550	1350	0.3	318	1060	1236
» » 107. .	» 24. . . .	0.1½	20	132	0.4	127	317	0.2	6	30	159
» » 108. .	» 48. . . .	0.2	0	0	0.4	0	0	0.2	0	0	0
» » 109. .	» 60. . . .	0.1½	0	0	0.5	0	0	0.3	0	0	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

del caldo.

Animali tenuti a + 30°, + 35° C.

Animali in esperimento	Tempo trascorso tra l'inalazione del B. prodigioso e la ricerca dello stesso	Parti del polmone prese in esame: Apice polmone destro — Volume esaminato in cmc.	Apice polmone destro — Numero di colonie di B. prodigioso contate	Apice polmone destro — Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	A ½ del lobo inferiore destro con grosso bronco — Volume esaminato in cmc.	A ½ del lobo inferiore destro con grosso bronco — Numero di colonie di B. prodigioso contate	A ½ del lobo inferiore destro con grosso bronco — Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	Base polmone sinistro — Volume esaminato in cmc.	Base polmone sinistro — Numero di colonie di B. prodigioso contate	Base polmone sinistro — Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	Numero medio di B. prodigioso trovato per cmc. di polmone
					Ia Serie — 31 gennaio 1906.						
Cavia n. 92. .	ore 12. . . .	0.2	173	865	0.4	585	1462	0.4	291	727	1018
» » 93. .	» 24. . . .	0.2	10	50	0.4	44	110	0.4	23	57	72
» » 94. .	» 48. . . .	0.2½	0	0	0.4	0	0	0.4	7	17	5
» » 95. .	» 60. . . .	0.1½	0	0	0.5	2	4	0.3	0	0	1
» » 96. .	» 72. . . .	0.2	0	0	0.3	0	0	0.4	0	0	9
					IIa Serie — 12 febbraio 1906.						
Cavia n. 101. .	ore 12. . . .	0.2	192	960	0.4	458	1145	0.2	117	585	896
» » 102. .	» 24. . . .	0.2	16	80	0.4	35	87	0.3	16	53	73
» » 103. .	» 48. . . .	0.2½	0	0	0.4	2	5	0.3	0	0	1
» » 104. .	» 60. . . .	0.2	0	0	0.3	0	0	0.4	0	0	0
» » 105. .	» 72. . . .	0.2	0	0	0.5	0	0	0.3	0	0	0
					IIIa Serie — 22 febbraio 1906.						
Cavia n. 110. .	ore 12. . . .	0.2	156	730	0.4	729	1822	0.2½	295	1180	1260
» » 111. .	» 24. . . .	0.2	14	70	0.4	112	280	0.2	11	50	133
» » 112. .	» 48. . . .	0.1½	0	0	0.4	26	65	0.2½	29	76	43
» » 113. .	» 60. . . .	0.2½	0	0	0.3½	0	0	0.2	0	0	0
» » 114. .	» 72. . .	0.1½	0	0	0.3½	0	0	0.3	0	0	0

Azione

TABELLA V.

Animali controlli.

Animali in esperimento	Tempo trascorso tra l'inalazione del B. prodigioso e la ricerca dello stesso	Parti del polmone prese in esame — Apice polmone destro			A ½ del lobo inferiore destro con grosso bronco			Base polmone sinistro			Numero medio di B. prodigioso trovato per cmc. di polmone
		Volume esaminato in cmc.	Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	Volume esaminato in cmc.	Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	Volume esaminato in cmc.	Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	
				Iª *Serie* — *22 marzo 1906.*							
Cavia n. 115. .	ore 12. . . .	0.1	108	1080	0.5	418	836	0.3	272	906	940
» » 116. .	» 24. . . .	0.1½	10	66	0.4	380	950	0.3	90	300	438
» » 117. .	» 48. . . .	0.1½	0	0	0.4	0	0	0.2½	0	0	0
» » 118. .	» 72. . . .	0.1½	0	0	0.4	0	0	0.2½	0	0	0
				IIª *Serie* — *3 maggio 1906.*							
Cavia n. 123. .	ore 12. . . .	0.1	182	1820	0.4	474	1185	0.3	199	633	1212
» » 124. .	» 24. . . .	0.2	102	510	0.4	5	12	0.3½	10	32	184
» » 125. .	» 48. . . .	0.1	0	0	0.3	0	0	0.2	0	0	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
				IIIª *Serie* — *9 maggio 1906.*							
Cavia n. 130. .	ore 12. . . .	0.2	134	670	0.4	319	797	0.3	294	980	815
» » 131. .	» 24. . . .	0.1	35	350	0.3	217	720	0.2	16	80	383
» » 132. .	» 48. . . .	0.1½	0	0	0.5	2	4	0.3	0	0	1
» » 133. .	» 72. . . .	0.1½	0	0	0.4	0	0	0.4	0	0	0

del bagno.

Animali tenuti in bagno (a + 30° + 35° C.).

Animali in esperimento	Tempo trascorso tra l'inalazione del B. prodigioso e la ricerca dello stesso	Parti del polmone prese in esame: Apice polmone destro — Volume esaminato in cmc.	Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	A ½ del lobo inferiore destro con grosso bronco — Volume esaminato in cmc.	Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	Base polmone sinistro — Volume esaminato in cmc.	Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	Numero medio di B. prodigioso trovato per cmc. di polmone
				*I*ª *Serie — 22 marzo 1906.*							
Cavia n. 119. .	ore 12. . . .	0.1	182	1820	0.4	494	1235	0.3	313	1010	1355
» » 120. .	» 24. . . .	0.1½	5	32	0.4	380	950	0.3	220	733	571
» » 121. .	» 48. . . .	0.2	53	265	0.4	41	102	0.3	65	216	194
» » 122. .	» 72. . . .	0.1½	0	0	0.4	25	62	0.2½	0	0	20
				IIª *Serie — 3 maggio 1906.*							
Cavia n. 126. .	ore 12. . . .	0.1	206	2060	0.4½	798	1772	manca per rottura del cilindro			1916
» » 127. .	» 24. . . .	0.1	48	480	0.5	216	432	0.3	162	540	484
» » 128. .	» 48. . . .	0.1½	0	0	0.5	157	314	0.3	82	273	195
» » 129. .	» 72. . . .	0.1½	0	0	0.5	0	0	0.3	0	0	0
				IIIª *Serie — 9 maggio 1906.*							
Cavia n. 134. .	ore 12. . . .	0.2	124	620	0.5	500	1180	0.3	401	1336	1045
» » 135. .	» 24. . . .	0.1½	40	266	0.4	412	1030	0.2	72	360	552
» » 136. .	» 48. . . .	0.1	0	0	0.4	0	0	0.3	0	0	0
» » 137. .	» 72. . . .	0.1	6	60	0.5	10	20	0.2	34	170	83

TABELLA VI.

Animali controlli.

Animali in esperimento	Tempo trascorso tra l'inalazione del B. prodigioso e la ricerca dello stesso	Parti del polmone prese in esame: Apice polmone destro — Volume esaminato in cmc.	Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	A ½ del lobo inferiore destro con grosso bronco — Volume esaminato in cmc.	Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	Base polmone sinistro — Volume esaminato in cmc.	Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	Numero medio di B. prodigioso trovato per cmc. di polmone
Iª *Serie — 2 aprile 1906.*											
Cavia n. 138. .	ore 12. . . .	0.2	1	5	0.4	239	597	0.3	153	510	870
» » 139. .	» 24. . . .	0.1½	10	66	0·4	15	37	0.3	0	0	34
» » 140. .	» 48. . . .	0.1½	0	0	0.4	0	0	0.3	0	0	0
» » 141. .	» 72. . . .	0.2	0	0	0.3½	0	0	0.2½	0	0	0
IIª *Serie — 11 aprile 1906.*											
Cavia n. 146. .	ore 12. . . .	0.1½	35	232	0.4	450	1125	0.3	338	1126	827
» » 147. .	» 24. . . .	0.1½	4	26	0.4½	48	106	0.3	25	83	71
» » 148. .	» 48. . . .	0.1	0	0	0.4	0	0	0.3	0	0	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
IIIª *Serie — 20 aprile 1906.*											
Cavia n. 153. .	ore 12. . . .	0.1	12	120	0.5	318	636	0.3	212	706	487
» » 154. .	» 24. . . .	0.2	22	110	0.4	39	97	0.2	12	60	89
» » 155. .	» 48. . . .	0.1½	0	0	0.4½	0	0	0.3	0	0	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

della fatica.

Animali affaticati.

Animali in esperimento	Tempo trascorso tra l'inalazione del B. prodigioso e la ricerca dello stesso	Parti del polmone prese in esame: Apice polmone destro			A ½ del lobo inferiore destro con grosso bronco			Base polmone sinistro			Numero medio di B. prodigioso trovato per cmc. di polmone
		Volume esaminato in cmc.	Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	Volume esaminato in cmc.	Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	Volume esaminato in cmc.	Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc di polmone	
				*I*ª *Serie — 2 aprile 1906.*							
Cavia n. 142. .	ore 12. . . .	0.1½	100	666	0.3	536	1786	0.3	113	376	949
» » 143. .	» 24. . . .	0.1½	11	72	0.4	75	187	0.2½	129	516	258
» » 144. .	» 48. . . .	0.1½	35	232	0.4	2	5	0.3	0	0	79
» » 145. .	» 72. . . .	0.1½	0	0	0.5	37	74	0.2	0	0	23
				*II*ª *Serie — 11 aprile 1906.*							
Cavia n. 149. .	ore 12. . . .	0.1½	151	1006	0.4	621	1552	0.3	131	436	991
» » 150. .	» 24. . . .	0.1½	20	132	0.4	50	124	0.3	23	76	110
» » 151. .	» 48. . . .	0.1½	150	1000	0.4	20	50	0.3½	35	100	383
» » 152. .	» 72. . . .	0.1½	6	40	0.4	88	220	0.3	0	0	86
				*III*ª *Serie — 20 aprile 1906.*							
Cavia n. 156. .	ore 12. . . .	0.1	86	860	0.4	602	1504	0.3	92	306	890
» » 157. .	» 24. . . .	0.1½	44	292	0.5	176	352	0.3	68	226	290
» » 158. .	» 48. . . .	0.2	38	190	0.4	48	120	0.2	42	210	173
» » 159. .	» 72. . . .	0.1½	12	80	0.4	16	40	0.3	3	10	43
» » 160. .	» 96. . . .	0.1½	0	0	0.5	0	0	0.2½	0	0	0

Azione

Animali

TABELLA VII.

Animali in esperimento	Tempo trascorso tra l'inalazione del B. prodigioso e la ricerca dello stesso	Polmone traumatizzato: Porzione *A* parte lesa dal trauma	Volume esaminato	Numero di colonie di B. prodioso contate	Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	Porzione *B* presa a distanza dal punto traumatizzato	Volume esaminato
							Ia *Serie* —
Cavia n. 161.......	ore 6	a ½ lobo inferiore destro	0.4	1129	2822	apice polmone destro	0.1
» » 162.......	» 24	parte inferiore lobo inferiore destro	0.4½	160	400	apice polmone destro	0.2
» » 163.......	» 48	lobo superiore destro parte inferiore	0.3	3	10	base lobo inferiore destro	0.2
» » 164.......	» 54	lobo superiore destro parte inferiore	0.2½	29	116	base lobo inferiore destro	0.2
» » 165.......	» 72	lobo superiore sinistro parte inferiore	0.4	8	20	apice sinistro	0.1
							IIa *Serie* -
Cavia n. 169.......	ore 6	a ½ lobo inferiore sinistro	0.4	788	1970	apice sinistro	0.2½
» » 170.......	» 24	a ½ lobo inferiore destro	0.3	182	606	apice destro	0.2
» » 171.......	» 48	a ½ lobo inferiore destro parte inferiore	0.5	256	512	lobo inferiore destro parte superiore	0.2
» » 172.......	» 54	lobo superiore sinistro parte inferiore	0.2	20	100	apice sinistro	0.2

dei traumi.

traumatizzati.

Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportate ad 1 cmc. di polmone	Polmone dall'altro lato non traumatizzato: Porzione *C* corrispondente a quella dell'altro polmone lesa dal trauma	Volume esaminato	Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportate ad 1 cmc. di polmone	Porzione *D* corrispondente a quella dell'altro polmone presa a distanza dal punto traumatizzato	Volume esaminato	Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportate ad 1 cmc. di polmone
marzo 1906.									
98	980	a ½ lobo inferiore sinistro	0.4	715	1787	apice polmone sinistro	0.2	204	1020
24	120	parte inferiore lobo inferiore sinistro	0.4	105	262	apice polmone sinistro	0.1	8	80
0	0	lobo superiore sinistro parte inferiore	0.3	0	0	base lobo inferiore sinistro	0.1	0	0
0	0	lobo superiore sinistro parte inferiore	0.2½	0	0	base lobo inferiore sinistro	0.2	0	0
2	20	lobo superiore destro parte inferiore	0.4	0	0	apice destro	0.1	0	0
maggio 1906.									
154	616	a ½ lobo inferiore destro	0.4	532	1330	apice destro	0.2	104	520
6	30	a ½ lobo inferiore sinistro	0.3	8	26	apice sinistro	0.1	7	70
8	40	lobo inferiore sinistro parte inferiore	0.3½	6	16	lobo inferiore destro parte superiore	0.2½	0	0
2	10	lobo superiore destro parte inferiore	0.3	0	0	apice destro	0.1½	0	0

Azione del

Animali

TABELLA VII *bis*.

Animali in esperimento	Tempo trascorso tra l'inalazione del B. prodigioso e la ricerca dello stesso	Polmone corrispondente a quello traumatizzato					
		Porzione *A* corrispondente alla parte lesa dal trauma	Volume esaminato	Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	Porzione *B* corrispondente a quella presa a distanza dal punto traumatizzato	Volume esaminato
I[a] *Serie* –							
Cavie n. 166.......	ore 6	a ½ lobo inferiore destro	0.4	635	1587	apice polmone destro	0.2
» » 167.......	» 24	parte inferiore lobo inferiore destro	0.4½	62	186	apice polmone destro	0.2
» » 168..... ..	» 48	lobo superiore destro parte inferiore	0.4	0	0	base lobo inferiore destro	0.1½
II[a] *Serie*							
Cavie n. 173.......	ore 6	a ½ lobo inferiore sinistro	0.4	506	1260	apice sinistro	0.1
» » 174.......	» 24	a ½ lobo inferiore destro	0.2½	14	56	apice destro	0.
» » 175.......	» 48	a ½ lobo inferiore destro parte inferiore	0.5	1	10	lobo inferiore destro	0.

traumi.

controlli.

Numero di colonie di B. prodigioso contato	Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	Polmone corrispondente a quello non traumatizzato							
		Porzione *C* corrispondente a quella dell'altro polmone lesa dal trauma	Volume esaminato	Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportate ad 1 cmc. di polmone	Porzione *D* corrispondente a quella dell'altro polmone presa a distanza dal punto traumatizzato	Volume esaminato	Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportate ad 1 cmc. di polmone
5 marzo 1906.									
208	1040	a ½ lobo inferiore sinistro	0.3	742	2470	apice polmone sinistro	0.1	194	1940
21	105	parte inferiore lobo sinistro	0.2½	40	160	apice polmone sinistro	0.1	0	0
0	0	lobo superiore sinistro parte inferiore	0.3	0	0	base lobo inferiore sinistro	0.2	0	0
3 maggio 1906.									
89	890	a ½ lobo inferiore destro	0.2½	394	1576	apice destro	0.1	106	1060
12	60	a ½ lobo inferiore sinistro	0.5	20	40	apice sinistro	0.2	2	10
0	0	lobo inferiore sinistro	0.4	0	0	lobo inferiore destro parte superiore	0.½	0	0

Azione delle

TABELLA VIII.

Animali controlli.

Animali in esperimento	Tempo trascorso tra l'inalazione del B. prodigioso e la ricerca dello stesso	Parti del polmone prese in esame — Apice polmone destro — Volume esaminato in cmc.	Apice polmone destro — Numero di colonie di B. prodigioso contate	Apice polmone destro — Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	A ½ del lobo inferiore destro con grosso bronco — Volume esaminato in cmc.	A ½ del lobo inferiore destro con grosso bronco — Numero di colonie di B. prodigioso contate	A ½ del lobo inferiore destro con grosso bronco — Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	Base polmone sinistro — Volume esaminato in cmc.	Base polmone sinistro — Numero di colonie di B. prodigioso contato	Base polmone sinistro — Numero delle colonie rapportate ad 1 cmc. di polmone	Numero medio di B. prodigioso trovato per cmc. di polmone
					Ia *Serie — 13 marzo 1906.*						
Cavia n. 176. .	ore 12. . . .	0.2	56	280	0.4	128	320	0.2½	80	320	300
» » 177. .	» 24. . . .	0.2	0	0	0.4	70	175	0.3	3	10	61
» » 178. .	» 48. . . .	0.2	0	0	0.4	0	0	0.3	0	0	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
					IIa *Serie — 21 marzo 1906.*						
Cavia n. 183. .	ore 12. . . .	0.1½	100	666	0.4	380	950	0.3	90	300	638
» » 184. .	» 24. . . .	0.1	28	280	0.5	46	92	0.2½	10	40	104
» » 185. .	» 48. . . .	0.2	0	0	0.4	0	0	0.3	0	0	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Animali controlli.

					Ia *Serie — 13 marzo 1906.*						
Cavia n. 176. .	ore 12. . . .	0.2	56	280	0.4	128	320	0.2½	80	320	306
» » 177. .	» 24. . . .	0.2	0	0	.4	70	175	0.3	3	10	61
» » 178. .	» 48. . . .	0.2	0	0	0.4	0	0	0.3	0	0	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
					IIa *Serie — 21 marzo 1906.*						
Cavia n. 183. .	ore 12. . . .	0.1½	100	666	0.4	380	950	0.3	90	300	638
» » 184. .	» 24. . . .	0.1	28	280	0.5	46	92	0.2½	10	40	104
» » 185. .	» 48. . . .	0.2	0	0	0.4	0	0	0.3	0	0	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

polveri.

Animali che inalarono per un mese aria carica di polvere.

Animali in esperimento	Tempo trascorso tra l'inalazione del B. prodigioso e la ricerca dello stesso	Parti del polmone prese in esame — Apice polmone destro: Volume esaminato in cmc.	Apice polmone destro: Numero di colonie di B. prodigioso contate	Apice polmone destro: Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	A ½ del lobo inferiore destro con grosso bronco: Volume esaminato in cmc.	A ½ del lobo inferiore destro con grosso bronco: Numero di colonie di B. prodigioso contate	A ½ del lobo inferiore destro con grosso bronco: Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	Base polmone sinistro: Volume esaminato in cmc.	Base polmone sinistro: Numero di colonie di B. prodigioso contate	Base polmone sinistro: Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	Numero medio di B. prodigioso trovato per cmc. di polmone
Animali che respirarono per un mese aria carica di polvere di licopodio.											
I[a] *Serie — 13 marzo 1906.*											
Cavia n. 179. .	ore 12. . . .	0.2	75	375	0.5	399	798	0.2	73	365	546
» » 180. .	» 24. . . .	0.2	12	60	0.4	98	245	0.3	31	108	136
» » 181. .	» 48. . . .	0.2	0	0	0.4	6	15	0.2½	0	0	5
» » 182. .	» 72. . . .	0.1½	0	0	0.4	0	0	0.3	0	0	0
II[a] *Serie — 21 marzo 1906.*											
Cavia n. 186. .	ore 12. . . .	0.2	106	530	0.5	404	808	0.2½	126	504	614
» » 187. .	» 24. . . .	0.1	7	70	0.5	70	140	0.2½	42	168	126
» » 188. .	» 48. . . .	0.2	4	20	0.5	6	12	0.2½	1	4	12
» » 189. .	» 72. . . .	0.1½	0	0	0.5	0	0	0.3	0	0	4
Animali che respirarono per un mese aria carica di polvere di smeriglio.											
I[a] *Serie — 13 marzo 1906.*											
Cavia n. 190. .	ore 12. . . .	0.2	176	880	0.5	590	1180	0.2½	193	772	940
» » 191. .	» 24. . . .	0.2	17	85	0.4	60	200	0.3	6	20	101
» » 192. .	» 48. . . .	0.1½	0	0	0 5	50	100	0.2½	12	48	49
» » 193. .	» 72. . . .	0.1½	0	0	0.4	30	75	0.3	0	0	25
II[a] *Serie — 21 marzo 1906.*											
Cavia n. 194. .	ore 12. . . .	0.2	122	610	0.5	543	1086	0.3	216	720	805
» » 195. .	» 24. . . .	0.1½	75	500	0.4	474	1185	0.2½	102	408	697
» » 196. .	» 48. . . .	0.1	2	20	0.5	28	56	0.2½	8	32	36
» » 197. .	» 72. . . .	0.2	0	0	0.4	16	40	0.2½	12	48	29

Azione

TABELLA IX.

Animali controlli.

Animali in esperimento	Tempo trascorso tra l'inalazione del B. prodigioso e la ricerca dello stesso	Parti del polmone prese in esame: Apice polmone destro — Volume esaminato in cmc.	Apice polmone destro — Numero di colonie di B. prodigioso contate	Apice polmone destro — Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	A ½ del lobo inferiore destro con grosso bronco — Volume esaminato in cmc.	A ½ del lobo inferiore destro con grosso bronco — Numero di colonie di B. prodigioso contate	A ½ del lobo inferiore destro con grosso bronco — Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	Base polmone sinistro — Volume esaminato in cmc.	Base polmone sinistro — Numero di colonie di B. prodigioso contate	Base polmone sinistro — Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	Numero medio di B. prodigioso trovato per cmc. di polmone
I. GRUPPO											
Iª *Serie — 12 aprile 1906.*											
Cavia n. 198. .	ore 12. . . .	0.2	19	95	0.4	339	847	0.3	150	500	48
» » 199. .	» 24. . . .	0.2½	20	80	0.4	24	60	0.3	6	20	53
» » 200. .	» 48. . . .	0.2	0	0	0.4	0	0	0.3	0	0	0
IIª *Serie — 21 aprile 1906.*											
Cavia n. 205. .	ore 12. . . .	0.1	28	280	0.4	465	1162	0.2½	275	1100	848
» » 206. .	» 24. . . .	0.2	8	40	0.5	68	136	0.2	26	130	102
» » 207. .	» 48. . . .	0.2	3	15	0.4	0	0	0.3	0	0	5
IIIª *Serie — 3 maggio 1906.*											
Cavia n. 212. .	ore 12. . . .	0.1	182	1820	0.4	474	1185	0.3	199	633	1212
» » 213. .	» 24. . . .	0.2	102	510	0.4	5	12	0.3½	10	32	184
» » 214. .	» 48. . . .	0.1	0	0	0.3	0	0	0.2	0	0	0

dell'alcool.

Animali che subirono le inoculazioni di 4 cmc. al dì di soluzione alcoolica al 45 % dopo l'innesto del B. prodigioso.

Animali in esperimento	Tempo trascorso tra l'inalazione del B. prodigioso e la ricerca dello stesso	Parti del polmone prese in esame — Apice polmone destro: Volume esaminato in cmc.	Apice polmone destro: Numero di colonie di B. prodigioso contate	Apice polmone destro: Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	A ½ del lobo inferiore destro con grosso bronco: Volume esaminato in cmc.	A ½ del lobo inferiore destro con grosso bronco: Numero di colonie di B. prodigioso contate	A ½ del lobo inferiore destro con grosso bronco: Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	Base polmone sinistro: Volume esaminato in cmc.	Base polmone sinistro: Numero di colonie di B. prodigioso contate	Base polmone sinistro: Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	Numero medio di B. prodigioso trovato per cmc. di polmone
I. GRUPPO											
Iª *Serie — 12 aprile 1906.*											
Cavia n. 201. .	ore 12. . . .	0.1½	3	10	0.4½	162	360	0.3	33	110	160
» » 202. .	» 24. . . .	0.1	0	0	0.4	0	0	0.3	0	0	0
» » 203. .	» 48. . . .	0.1½	0	0	0.4	0	0	0.3½	0	0	0
» » 204. .	» 72. . . .	0.1	0	0	0.5	0	0	0.3	0	0	0
IIª *Serie — 21 aprile 1906.*											
Cavia n. 208. .	ore 12. . . .	0.1	42	420	0.4	268	670	0.3	115	380	490
» » 209. .	» 24. . . .	0.1½	0	0	0.4	0	0	0.3	28	93	31
» » 210. .	» 48. . . .	0.1½	0	0	0.4	0	0	0.3	0	0	0
» » 211. .	» 72. . . .	0.1½	0	0	0.5	0	0	0.4	0	0	0
IIIª *Serie — 3 maggio 1906.*											
Cavia n. 215. .	ore 12. . . .	0.1½	122	812	0.5½	453	822	0.3	151	503	712
» » 216. .	» 24. . . .	0.1	5	50	0.4	31	77	0.3	3	10	45
» » 217. .	» 48. . . .	0.2	0	0	0.4	0	0	0.3	0	0	0
» » 218. .	» 72. . . .	0.1	0	0	0.6	0	0	0.3	0	0	0

TABELLA VI.

Animali controlli.

Animali in esperimento	Tempo trascorso tra l'inalazione del B. prodigioso e la ricerca dello stesso	Parti del polmone prese in esame: Apice polmone destro			A ½ del lobo inferiore destro con grosso bronco			Base polmone sinistro			Numero medio di B. prodigioso trovato per cmc. di polmone
		Volume esaminato in cmc.	Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	Volume esaminato in cmc.	Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	Volume esaminato in cmc.	Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	
Iª Serie — 2 aprile 1906.											
Cavia n. 138. .	ore 12. . . .	0.2	1	5	0.4	239	597	0.3	153	510	370
» » 139. .	» 24. . . .	0.1½	10	66	0·4	15	37	0.3	0	0	34
» » 140. .	» 48. . . .	0.1½	0	0	0.4	0	0	0.3	0	0	0
» » 141. .	» 72. . . .	0.2	0	0	0.3½	0	0	0.2½	0	0	0
IIª Serie — 11 aprile 1906.											
Cavia n. 146. .	ore 12. . . .	0.1½	35	232	0.4	450	1125	0.3	338	1126	827
» » 147. .	» 24. . . .	0.1½	4	26	0.4½	48	106	0.3	25	83	71
» » 148. .	» 48. . . .	0.1	0	0	0.4	0	0	0.3	0	0	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
IIIª Serie — 20 aprile 1906.											
Cavia n. 153. .	ore 12. . . .	0.1	12	120	0.5	318	636	0.3	212	706	487
» » 154. .	» 24. . . .	0.2	22	110	0.4	39	97	0.2	12	60	89
» » 155. .	» 48. . . .	0.1½	0	0	0.4½	0	0	0.3	0	0	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

della fatica.

Animali affaticati.

Animali in esperimento	Tempo trascorso tra l'inalazione del B. prodigioso e la ricerca dello stesso	Parti del polmone prese in esame — Apice polmone destro			A ½ del lobo inferiore destro con grosso bronco			Base polmone sinistro			Numero medio di B. prodigioso trovato per cmc. di polmone
		Volume esaminato in cmc.	Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	Volume esaminato in cmc.	Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	Volume esaminato in cmc.	Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	
				Iª Serie — 2 aprile 1906.							
Cavia n. 142. .	ore 12. . . .	0.1½	100	666	0.3	536	1786	0.3	113	376	949
» » 143. .	» 24. . . .	0.1½	11	72	0.4	75	187	0.2½	129	516	258
» » 144. .	» 48. . . .	0.1½	35	232	0.4	2	5	0.3	0	0	79
» » 145. .	» 72. . . .	0.1½	0	0	0.5	37	74	0.2	0	0	23
				IIª Serie — 11 aprile 1906.							
Cavia n. 149. .	ore 12. . . .	0.1½	151	1006	0.4	621	1552	0.3	131	436	991
» » 150. .	» 24. . . .	0.1½	20	132	0.4	50	124	0.3	23	76	110
» » 151. .	» 48. . . .	0.1½	150	1000	0.4	20	50	0.3½	35	100	383
» » 152. .	» 72. . . .	0.1½	6	40	0.4	88	220	0.3	0	0	86
				IIIª Serie — 20 aprile 1906.							
Cavia n. 156. .	ore 12. . . .	0.1	86	860	0.4	602	1504	0.3	92	306	890
» » 157. .	» 24. . . .	0.1½	44	292	0.5	176	352	0.3	68	226	290
» » 158. .	» 48. . . .	0.2	38	190	0.4	48	120	0.2	42	210	173
» » 159. .	» 72. . . .	0.1½	12	80	0.4	16	40	0.3	3	10	43
» » 160. .	» 96. . . .	0.1½	0	0	0.5	0	0	0.2½	0	0	0

Azione

Animali

TABELLA VII.

Animali in esperimento	Tempo trascorso tra l'inalazione del B. prodigioso e la ricerca dello stesso	Polmone traumatizzato: Porzione *A* parte lesa dal trauma	Volume esaminato	Numero di colonie di B. prodioso contate	Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	Porzione *B* presa a distanza dal punto traumatizzato	Volume esaminato
							Iª *Serie* —
Cavia n. 161.......	ore 6	a ½ lobo inferiore destro	0.4	1129	2822	apice polmone destro	0.1
» » 162.......	» 24	parte inferiore lobo inferiore destro	0.4½	160	400	apice polmone destro	0.2
» » 163.......	» 48	lobo superiore destro parte inferiore	0.3	3	10	base lobo inferiore destro	0.2
» » 164.......	» 54	lobo superiore destro parte inferiore	0.2½	29	116	base lobo inferiore destro	0.2
» » 165.......	» 72	lobo superiore sinistro parte inferiore	0.4	8	20	apice sinistro	0.1
							IIª *Serie* —
Cavia n. 169.......	ore 6	a ½ lobo inferiore sinistro	0.4	788	1970	apice sinistro	0.2½
» » 170.......	» 24	a ½ lobo inferiore destro	0.3	182	606	apice destro	0.2
» » 171.......	» 48	a ½ lobo inferiore destro parte inferiore	0.5	256	512	lobo inferiore destro parte superiore	0.2
» » 172.......	» 54	lobo superiore sinistro parte inferiore	0.2	20	100	apice sinistro	0.2

dei traumi.

traumatizzati.

		Polmone dall'altro lato non traumatizzato							
Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportate ad 1 cmc. di polmone	Porzione *C* corrispondente a quella dell'altro polmone lesa dal trauma	Volume esaminato	Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportate ad 1 cmc. di polmone	Porzione *D* corrispondente a quella dell'altro polmone presa a distanza dal punto traumatizzato	Volume esaminato	Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportate ad 1 cmc. di polmone
marzo 1906.									
98	980	a ½ lobo inferiore sinistro	0.4	715	1787	apice polmone sinistro	0.2	204	1020
24	120	parte inferiore lobo inferiore sinistro	0.4	105	262	apice polmone sinistro	0.1	8	80
0	0	lobo superiore sinistro parte inferiore	0.3	0	0	base lobo inferiore sinistro	0.1	0	0
0	0	lobo superiore sinistro parte inferiore	0.2½	0	0	base lobo inferiore sinistro	0.2	0	0
2	20	lobo superiore destro parte inferiore	0.4	0	0	apice destro	0.1	0	0
maggio 1906.									
154	616	a ½ lobo inferiore destro	0.4	532	1330	apice destro	0.2	104	520
6	30	a ½ lobo inferiore sinistro	0.3	8	26	apice sinistro	0.1	7	70
8	40	lobo inferiore sinistro parte inferiore	0.3½	6	16	lobo inferiore destro parte superiore	0.2½	0	0
2	10	lobo superiore destro parte inferiore	0.3	0	0	apice destro	0.1½	0	0

Azione de

Animal

TABELLA VII *bis*.

Animali in esperimento	Tempo trascorso tra l'inalazione del B. prodigioso e la ricerca dello stesso	Polmone corrispondente a quello traumatizzato					
		Porzione *A* corrispondente alla parte lesa dal trauma	Volume esaminato	Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	Porzione *B* corrispondente a quella presa a distanza dal punto traumatizzato	Volume esaminato
Iª *Serie* -							
Cavie n. 166.......	ore 6	a ½ lobo inferiore destro	0.4	635	1587	apice polmone destro	0.2
» » 167.......	» 24	parte inferiore lobo inferiore destro	0.4½	62	186	apice polmone destro	0.2
» » 168..... ..	» 48	lobo superiore destro parte inferiore	0.4	0	0	base lobo inferiore destro	0.1½
IIª *Serie*							
Cavie n. 173.......	ore 6	a ½ lobo inferiore sinistro	0.4	506	1260	apice sinistro	0.1
» » 174.......	» 24	a ½ lobo inferiore destro	0.2½	14	56	apice destro	0.[illegible]
» » 175.......	» 48	a ½ lobo inferiore destro parte inferiore	0.5	1	10	lobo inferiore destro	0.[illegible]

traumi.

controlli.

		Polmone corrispondente a quello non traumatizzato							
Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	Porzione *C* corrispondente a quella dell'altro polmone lesa dal trauma	Volume esaminato	Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportate ad 1 cmc. di polmone	Porzione *D* corrispondente a quella dell' altro polmone presa a distanza dal punto traumatizzato	Volume esaminato	Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportate ad 1 cmc. di polmone
5 marzo 1906.									
208	1040	a ½ lobo inferiore sinistro	0.3	742	2470	apice polmone sinistro	0.1	194	1940
21	105	parte inferiore lobo sinistro	0.2½	40	160	apice polmone sinistro	0.1	0	0
0	0	lobo superiore sinistro parte inferiore	0.3	0	0	base lobo inferiore sinistro	0.2	0	0
3 maggio 1906.									
89	890	a ½ lobo inferiore destro	0.2½	394	1576	apice destro	0.1	106	1060
12	60	a ½ lobo inferiore sinistro	0.5	20	40	apice sinistro	0.2	2	10
0	0	lobo inferiore sinistro	0.4	0	0	lobo inferiore destro parte superiore	0.½	0	0

TABELLA VIII.

Animali controlli.

Animali in esperimento	Tempo trascorso tra l'inalazione del B. prodigioso e la ricerca dello stesso	Parti del polmone prese in esame: Apice polmone destro — Volume esaminato in cmc.	Apice polmone destro — Numero di colonie di B. prodigioso contate	Apice polmone destro — Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	A ½ del lobo inferiore destro con grosso bronco — Volume esaminato in cmc.	A ½ del lobo inferiore destro con grosso bronco — Numero di colonie di B. prodigioso contate	A ½ del lobo inferiore destro con grosso bronco — Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	Base polmone sinistro — Volume esaminato in cmc.	Base polmone sinistro — Numero di colonie di B. prodigioso contate	Base polmone sinistro — Numero delle colonie rapportate ad 1 cmc. di polmone	Numero medio di B. prodigioso trovato per cmc. di polmone
						Iª Serie — 13 marzo 1906.					
Cavia n. 176. .	ore 12. . . .	0.2	56	280	0.4	128	320	0.2½	80	320	300
» » 177. .	» 24. . . .	0.2	0	0	0.4	70	175	0.3	3	10	61
» » 178. .	» 48. . . .	0.2	0	0	0.4	0	0	0.3	0	0	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
						IIª Serie — 21 marzo 1906.					
Cavia n. 183. .	ore 12. . . .	0.1½	100	666	0.4	380	950	0.3	90	300	638
» » 184. .	» 24. . . .	0.1	28	280	0.5	46	92	0.2½	10	40	104
» » 185. .	» 48. . . .	0.2	0	0	0.4	0	0	0.3	0	0	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Animali controlli.

						Iª Serie — 13 marzo 1906.					
Cavia n. 176. .	ore 12. . . .	0.2	56	280	0.4	128	320	0.2½	80	320	306
» » 177. .	» 24. . . .	0.2	0	0	.4	70	175	0.3	3	10	61
» » 178. .	» 48. . . .	0.2	0	0	0.4	0	0	0.3	0	0	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
						IIª Serie — 21 marzo 1906.					
Cavia n. 183. .	ore 12. . . .	0.1½	100	666	0.4	380	950	0.3	90	300	638
» » 184. .	» 24. . . .	0.1	28	280	0.5	46	92	0.2½	10	40	104
» » 185. .	» 48. . . .	0.2	0	0	0.4	0	0	0.3	0	0	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

polveri.

Animali che inalarono per un mese aria carica di polvere.

Animali in esperimento	Tempo trascorso tra l'inalazione del B. prodigioso e la ricerca dello stesso	Parti del polmone prese in esame — Apice polmone destro — Volume esaminato in cmc.	Apice polmone destro — Numero di colonie di B. prodigioso contate	Apice polmone destro — Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	A ½ del lobo inferiore destro con grosso bronco — Volume esaminato in cmc.	A ½ del lobo inferiore destro con grosso bronco — Numero di colonie di B. prodigioso contate	A ½ del lobo inferiore destro con grosso bronco — Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	Base polmone sinistro — Volume esaminato in cmc.	Base polmone sinistro — Numero di colonie di B. prodigioso contate	Base polmone sinistro — Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	Numero medio di B. prodigioso trovato per cmc. di polmone
Animali che respirarono per un mese aria carica di polvere di licopodio.											
Iª *Serie — 13 marzo 1906.*											
Cavia n. 179. .	ore 12. . . .	0.2	75	375	0.5	399	798	0.2	73	365	546
» » 180. .	» 24. . . .	0.2	12	60	0.4	98	245	0.3	31	103	136
» » 181. .	» 48. . . .	0.2	0	0	0.4	6	15	0.2½	0	0	5
» » 182. .	» 72. . . .	0.1½	0	0	0.4	0	0	0.3	0	0	0
IIª *Serie — 21 marzo 1906.*											
Cavia n. 186. .	ore 12. . . .	0.2	106	530	0.5	404	808	0.2½	126	504	614
» » 187. .	» 24. . . .	0.1	7	70	0.5	70	140	0.2½	42	168	126
» » 188. .	» 48. . . .	0.2	4	20	0.5	6	12	0.2½	1	4	12
» » 189. .	» 72. . . .	0.1½	0	0	0.5	0	0	0.3	0	0	4
Animali che respirarono per un mese aria carica di polvere di smeriglio.											
Iª *Serie — 13 marzo 1906.*											
Cavia n. 190. .	ore 12. . . .	0.2	176	880	0.5	590	1180	0.2½	193	772	940
» » 191. .	» 24. . . .	0.2	17	85	0.4	60	200	0.3	6	20	101
» » 192. .	» 48. . . .	0.1½	0	0	0 5	50	100	0.2½	12	48	49
» » 193. .	» 72. . . .	0.1½	0	0	0.4	30	75	0.3	0	0	25
IIª *Serie — 21 marzo 1906.*											
Cavia n. 194. .	ore 12. . . .	0.2	122	610	0.5	543	1086	0.3	216	720	805
» » 195. .	» 24. . . .	0.1½	75	500	0.4	474	1185	0.2½	102	408	697
» » 196. .	» 48. . . .	0.1	2	20	0.5	28	56	0.2½	8	32	36
» » 197. .	» 72. . . .	0.2	0	0	0.4	16	40	0.2½	12	48	29

TABELLA IX.

Animali controlli.

Animali in esperimento	Tempo trascorso tra l'inalazione del B. prodigioso e la ricerca dello stesso	Parti del polmone prese in esame: Apice polmone destro — Volume esaminato in cmc.	Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	A ½ del lobo inferiore destro con grosso bronco — Volume esaminato in cmc.	Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	Base polmone sinistro — Volume esaminato in cmc.	Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	Numero medio di B. prodigioso trovato per cmc. di polmone
I. Gruppo											
Iª *Serie — 12 aprile 1906.*											
Cavia n. 198. .	ore 12. . . .	0.2	19	95	0.4	339	847	0.3	150	500	48
» » 199. .	» 24. . . .	0.2½	20	80	0.4	24	60	0.3	6	20	53
» » 200. .	» 48. . . .	0.2	0	0	0.4	0	0	0.3	0	0	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
IIª *Serie — 21 aprile 1906.*											
Cavia n. 205. .	ore 12. . . .	0.1	28	280	0.4	465	1162	0.2½	275	1100	848
» » 206. .	» 24. . . .	0.2	8	40	0.5	68	136	0.2	26	130	102
» » 207. .	» 48. . . .	0.2	3	15	0.4	0	0	0.3	0	0	5
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
IIIª *Serie — 3 maggio 1906.*											
Cavia n. 212. .	ore 12. . . .	0.1	182	1820	0.4	474	1185	0.3	190	633	1212
» » 213. .	» 24. . . .	0.2	102	510	0.4	5	12	0.3½	10	32	184
» » 214. .	» 48. . . .	0.1	0	0	0.3	0	0	0.2	0	0	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

dell'alcool.

Animali che subirono le inoculazioni di 4 cmc. al dì di soluzione alcoolica al 45 % dopo l'innesto del B. prodigioso.

Animali in esperimento	Tempo trascorso tra l'inalazione del B. prodigioso e la ricerca dello stesso	Parti del polmone prese in esame — Apice polmone destro: Volume esaminato in cmc.	Apice polmone destro: Numero di colonie di B. prodigioso contate	Apice polmone destro: Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	A ½ del lobo inferiore destro con grosso bronco: Volume esaminato in cmc.	A ½ del lobo inferiore destro con grosso bronco: Numero di colonie di B. prodigioso contate	A ½ del lobo inferiore destro con grosso bronco: Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	Base polmone sinistro: Volume esaminato in cmc.	Base polmone sinistro: Numero di colonie di B. prodigioso contate	Base polmone sinistro: Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	Numero medio di B. prodigioso trovato per cmc. di polmone
I. GRUPPO											
Iª Serie — 12 aprile 1906.											
Cavia n. 201. .	ore 12. . . .	0.1½	3	10	0.4½	162	360	0.3	33	110	160
» » 202. .	» 24. . . .	0.1	0	0	0.4	0	0	0.3	0	0	0
» » 203. .	» 48. . . .	0.1½	0	0	0.4	0	0	0.3½	0	0	0
» » 204. .	» 72. . . .	0.1	0	0	0.5	0	0	0.3	0	0	0
IIª Serie — 21 aprile 1906.											
Cavia n. 208. .	ore 12. . . .	0.1	42	420	0.4	268	670	0.3	115	380	490
» » 209. .	» 24. . . .	0.1½	0	0	0.4	0	0	0.3	28	93	31
» » 210. .	» 48. . . .	0.1½	0	0	0.4	0	0	0.3	0	0	0
» » 211. .	» 72. . . .	0.1½	0	0	0.5	0	0	0.4	0	0	0
IIIª Serie — 3 maggio 1906.											
Cavia n. 215. .	ore 12. . . .	0.1½	122	812	0.5½	453	822	0.3	151	503	712
» » 216. .	» 24. . . .	0.1	5	50	0.4	31	77	0.3	3	10	45
» » 217. .	» 48. . . .	0.2	0	0	0.4	0	0	0.3	0	0	0
» » 218. .	» 72. . . .	0.1	0	0	0.6	0	0	0.3	0	0	0

Animali controlli.

TABELLA X.

Animali in esperimento	Tempo trascorso tra l'inalazione del B. prodigioso e la ricerca dello stesso	Parti del polmone prese in esame — Apice polmone destro: Volume esaminato in cmc.	Apice polmone destro: Numero di colonie di B. prodigioso contate	Apice polmone destro: Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	A ½ del lobo inferiore destro con grosso bronco: Volume esaminato in cmc.	A ½ del lobo inferiore destro con grosso bronco: Numero di colonie di B. prodigioso contate	A ½ del lobo inferiore destro con grosso bronco: Numero delle colonie rapportato da 1 cmc. di polmone	Base polmone sinistro: Volume esaminato in cmc.	Base polmone sinistro: Numero di colonie di B. prodigioso contate	Base polmone sinistro: Numero delle colonie rapportato da 1 cmc. di polmone	Numero medio di B. prodigioso trovato per cmc. di polmone
II. GRUPPO											
Iª *Serie — 9 giugno 1906.*											
Cavia n. 219. .	ore 12. . . .	0.2	120	600	0.2½	216	864	0.2½	160	640	701
» » 220. .	» 24. . . .	0.1	6	60	0.4	43	107	0.2½	49	196	121
» » 221. .	» 48. . . .	0.2	0	0	0.5	8	16	0.3	0	0	5
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
IIª *Serie — 15 giugno 1906.*											
Cavia n. 226. .	ore 12. . . .	0.1	70	700	0.5	460	920	0.2	128	640	753
» » 227. .	» 24. . . .	0.2	22	110	0.4	36	90	0.2½	52	208	136
» » 228. .	» 48. . . .	0.1½	0	0	0.3	0	0	0.3	0	0	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
III. GRUPPO											
Iª *Serie — 9 giugno 1906.*											
Cavia n. 219. .	ore 12. . . .	0.2	120	600	0.2½	216	864	0.2½	160	640	701
» » 220. .	» 24. . . .	0.1	6	60	0.4	43	107	0.2½	49	196	121
» » 221. .	» 48. . . .	0.2	0	0	0.5	8	16	0.3	0	0	5
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
IIª *Serie — 15 giugno 1906.*											
Cavia n. 226. .	ore 12. . . .	0.1	70	700	0.5	460	920	0.2	128	640	753
» » 227. .	» 24. . . .	0.2	22	110	0.4	36	90	0.2½	52	208	136
» » 228. .	» 48. . . .	0.1½	0	0	0.3	0	0	0.3	0	0	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

dell'alcool.

Animali che subirono ogni giorno per la durata di un mese l'inoculazione di 2 cmc. di soluzione alcoolica a 45 %.

Animali in esperimento	Tempo trascorso tra l'inalazione del B. prodigioso e la ricerca dello stesso	Parti del polmone prese in esame: Apice polmone destro			A ½ del lobo inferiore destro con grosso bronco			Base polmone sinistro			Numero medio di B. prodigioso trovato per cmc. di polmone
		Volume esaminato in cmc.	Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	Volume esaminato in cmc.	Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	Volume esaminato in cmc.	Numero di colonie di B. prodigioso contate	Numero delle colonie rapportato ad 1 cmc. di polmone	
II. GRUPPO — Le inoculazioni d'alcool si continuarono anche dopo l'innesto del B. prodigioso.											
I^a *Serie — 9 giugno 1906.*											
Cavia n. 222. .	ore 12. . . .	0.1	75	750	0.2½	180	720	0.2	165	825	765
» » 223. .	» 24. . .	0.2	10	50	0.4	167	417	0.3	86	286	251
» » 224. .	» 48. . . .	0.1½	0	0	0.3	0	0	0.3	0	0	0
» » 225. .	» 72. . . .	0.2	0	0	0.3	0	0	0.4	0	0	
II^a *Serie — 15 giugno 1906.*											
Cavia n. 229. .	ore 12. . . .	0.2	102	510	0.5	395	790	0.2½	96	384	561
» » 230. .	» 24. . . .	0.1	26	260	0.2½	32	128	0.4	40	100	162
» » 231. .	» 48. . . .	0.1	0	0	0.3	9	30	0.2½	1	4	11
» » 232. .	» 72. . . .	0.2	0	0	0.4	0	0	0.3	0	0	0
III. GRUPPO — Alle seguenti serie di animali si sospesero le inoculazioni di alcool dopo l'innesto del B. prodigioso.											
I^a *Serie — 9 giugno 1906.*											
Cavia n. 233. .	ore 12. . . .	0.2	210	1500	0.5	468	936	0.2½	365	1460	1298
» » 234. .	» 24. . . .	0.1½	40	264	0.3	165	550	0.2	42	210	341
» » 235. .	» 48. . . .	0.1	5	50	0.5	7	14	0.2	4	20	28
» » 236. .	» 72. . . .	0.1	0	0	0.4	4	10	0.3	6	20	10
II^a *Serie — 15 giugno 1906.*											
Cavia n. 237. .	ore 12. . . .	0.2	146	730	0.2½	210	840	0.2	190	950	840
» » 238. .	» 24. . . .	0.1½	20	132	0.5	320	640	0.2½	51	204	325
» » 239. .	» 48. . . .	0.1	3	30	0.4	48	120	0.2	12	60	70
» » 240. .	» 72. . . .	0.1	0	0	0.3	9	30	0.3	3	10	13

Sull'anemia da solfuro di carbonio

Ricerche cliniche e sperimentali

del dott. **CENCI FRANCESCO,** ufficiale sanitario.

I. — Notizie tecnologiche.

La chimica industriale ha saputo trar profitto anche di quella sostanza, che esce dagli oleifici, come materiale di rifiuto, sotto il nome di *sansa* o *sansina*, anticamente adibita come alimento del bestiame.

La piccola quantità di sostanza oleosa, che essa contiene, viene estratta per mezzo del solfuro di carbonio, potente solvente dei grassi, con macchine e procedimenti speciali, che ci dànno in una sola giornata anche parecchi quintali di olio, destinato alla fabbricazione dei saponi.

Il S^2C, essendo però assai dannoso, anzi venefico per l'uomo e per gli animali, non che immensamente pericoloso nel manovrarsi, perchè facilmente infiammabile, ha costretto gl'industriali, per ottenere con vantaggio e senza pericolo il loro scopo, a costruire stabilimenti e macchinari, che dessero la maggior sicurezza possibile.

In vero quasi tutti i fabbricati destinati a tale industria si rassomigliano e sono costruiti con gli stessi principi e criteri.

Quello, di cui mi occupo, è diviso in due corpi di fabbrica: nel primo è situato il motore e il generatore del vapore acqueo, sorvegliati dal macchinista e fuochista, che senza grande pericolo possono compiere il loro lavoro; nel secondo sta il macchinario, il quale consta di parecchi recipienti cilindrici (*estrattori*). In essi si pone la

sansa da un' apertura superiore, che poi si chiude ermeticamente con un coperchio ad autoclave. Per mezzo di un tubo, che con un rubinetto comunica con l'estremità inferiore del cilindro, vi si manda il S^2C, che a freddo estrae l'olio. Quindi olio e solfuro di carbonio per mezzo di un altro tubo, munito anche questo di rubinetto, vanno in un recipiente (*distillatore*) a chiusura perfetta, dove, essendo la temperatura mantenuta all'altezza necessaria per la evaporazione del S^2C, questo distilla e l'olio che bolle ad una temperatura assai più elevata del suo solvente resta nel distillatore. Il S^2C in vapori si condensa in un serpentino, che pesca in una vasca di acqua fredda (*cupa*) e da esso va in apposito serbatoio.

Intanto nella sansa, da cui è stato estratto l'olio, resta una certa quantità di S^2C. Esso viene portato via dal vapore acqueo, che si manda nel cilindro per mezzo di un altro tubo munito di rubinetto. S^2C e vapore acqueo vanno a condensarsi in altro serpentino, che pesca nella vasca, e si raccolgono in un recipiente (*serbatoio*), dove formano due strati per il diverso peso specifico. Quello dell'acqua, superiore, impedisce l'evaporazione del solfuro di carbonio. La sansa, raffreddata che sia, viene estratta dal cilindro da un'apertura situata in basso ad esso. Alcuni livelli indicano quando nel cilindro sono compiute le varie operazioni.

Teoricamente il macchinario sembra perfetto, agendo il solfuro di carbonio in tubi chiusi; ma in pratica invece per le chiusure non molto buone dei cilindri, per i facili guasti alle varie parti delle macchine, per il lavoro eccessivo, a cui vengono esse assoggettate, per la rapidità, con cui viene eseguito il lavamento della sansa nei cilindri, per il poco tempo, che passa da questa manovra alla estrazione, per l'uscita dal serbatoio dell'eccesso d'acqua, che contiene particelle di S^2C, per l'imperizia ed ignoranza del personale, costituito esclusivamente da campagnuoli e braccianti, ricorsi a quello stabilimento per ottenere una rimunerazione superiore di pochi centesimi a quella, che loro darebbe il lavoro campestre; per la mancanza di un direttore tecnico, le eventuali fughe di gas non sono rare e le piccole emanazioni sono continue.

Per queste ragioni la parte del fabbricato, dove stanno i cilindri, il distillatore, il serpentino e il serbatoio del S^2C ha superiormente ampie finestre, senza imposte, la cui superficie totale è tripla del pavimento e rappresenta metà delle pareti. Ma nella parte inferiore appena $^1/_{10}$ delle pareti è adibito all'areazione e $^1/_8$, se vi comprendiamo gl'ingressi. Ciò con grave danno degli operai, perchè il gas S^2C più pesante dell'aria si raccoglie sempre in basso e non

può essere eliminato con facilità, mancando lo stabilimento di speciali ventilatori. Di fatti basta avvicinarsi solamente a quel fabbricato, per avvertire le emanazioni di gas S^2C dall'odore penetrante e disgustoso, ed osservare superficialmente gli operai, quando sono stati alcune settimane in quello stabilimento, per sospettare il danno che ne ricevono. Il sospetto diviene poi certezza quando, interrogati, essi rispondono che la loro fisonomia subì il primo cambiamento poco dopo l'ingresso a quel lavoro ed i disturbi funzionali si manifestarono non di rado e seguirono spesso alle eventuali fughe del gas S^2C ed alla manovra della ripulitura della vasca, dove pesca il serpentino.

II. — Ricerche sull'aria.

Benchè per le ragioni accennate non vi sia dubbio che, quando anche le macchine funzionino in modo discreto, se non perfetto, nell'aria dello stabilimento vi sono vapori di S^2C, ho voluto averne la certezza esaminandola in vario modo.

Perciò preparata una soluzione alcoolica concentrata (30 %) di di KHO in alcool etilico assoluto, presane una quantità determinata (cmc. 20), vi ho fatto gorgogliare l'aria dello stabilimento, prima filtrata attraverso cotone idrofilo, servendomi come aspiratore di una botte ripiena d'acqua, lo sgorgo della quale veniva regolato da una chiavetta, perchè la soluzione di KHO potesse concentrare bene i vapori di S^2C, formando lo xantogenato di K. L'esperienza fu ripetuta più volte ed eseguita in località diverse dello stabilimento. L'aria fatta gorgogliare è stata sempre uguale, cioè litri 500 (mc. 0.500) per volta ed ha attraversato il liquido con una velocità di litri 30 all'ora ed è passata successivamente anche per due soluzioni di alcoolato di potassio. Sul liquido poi ho fatto reazioni qualitative ed analisi quantitative nel laboratorio chimico dell'Istituto tecnico di Spoleto con l'aiuto del direttore prof. Ricci.

Le prime hanno dato positiva la colorazione rosso-cremisi prima, bleu poi dello xantato d'ammonio fatta con soluzione di molibdato d'ammonio e aggiunta di H^2SO^4, così quella con soluzione di SO^4Cu col suo precipitato e colorazione giallo aranciato o citrino.

All'analisi quantitativa del S^2C con il dosaggio volumetrico del Gastin, che adopera una soluzione titolata di I in IK $N/_{50}$, che agisce sullo xantogenato di K, si sono avuti i seguenti risultati:

un metro cubo di aria del piano inferiore dello stabilimento, dopo 9 giorni di lavoro continuo, contiene mmgr. 96 di S^2C, pari a cmc. 326 dello stesso gas;

un metro cubo della stessa aria, dopo 24 ore di riposo, contiene mmgr. 47 di S^2C, pari a cmc. 160 dello stesso gas;

un metro cubo di aria, presa nello stesso punto, in un giorno di lavoro, mentre, per il cattivo funzionamento del macchinario, da alcuni rubinetti si avevano delle fughe di gas, contiene mmgr. 190 di S^2C, pari a cmc. 646 dello stesso gas. Tali fughe di gas S^2C sono non di rado assai abbondanti, poichè in una settimana di lavoro continuo si perdono circa cinque quintali di S^2C pari a mc. di gas 1700, che ci dànno una media giornaliera di mc. 273, quantità che nel normale funzionamento del macchinario dovrebbe essere ridotta di $^9/_{10}$.

III. — Tossicologia del S^2C.

I trattati sugli avvelenamenti ci mostrano un quadro della *intossicazione cronica* per S^2C negli stabilimenti per la vulcanizzazione del cautchouc, ma non si occupano particolarmente dell'azione del S^2C negli operai addetti all'estrazione dell'olio dalla sansa, perchè in questa operazione il S^2C agisce teoricamente in un sistema chiuso, e si crede quindi che sia evitato ogni pericolo.

Così lo Iaks nella collezione del Nothnagel (2), il Delpek (3), il Lehmann (4), il Kobert (5), ed anche ultimamente gli studi apparsi nel *Zeitschrift für Gewerbe-Hygiene*, ecc. (6) ci dànno quadri abbastanza chiari dell'avvelenamento cronico per S^2C e dei vari stadi di esso. Però in molti ho veduto appena accennati, in alcuni anche trascurati quei leggeri disturbi, che si osservano prima delle vertigini del vomito, dei dolori reumatoidi, della mancanza di appetito, considerati come sintomi di uno stato prodromico dell'avvelenamento cronico. Essi si osservano negli operai degli stabilimenti per l'estrazione dell'olio dalla sansa, dove le emanazioni gassose, sino a che non avvengano guasti nel macchinario ed il personale sia molto accorto, sono minime, ma continue. Le speciali alterazioni degli organi e delle funzioni in questi operai sono già abbastanza gravi, benchè non costituiscano il quadro classico dell'avvelenamento.

Non mi sarei però accinto a rivolgere le mie ricerche sulle *alterazioni prodotte nell'organismo dalle minime quantità di S^2C, che vengono aspirate negli stabilimenti per l'estrazione dell'olio di sansa,* se il caso disgraziato non mi ci avesse indotto.

Quanto io ho esaminato e studiato è stato eseguito con la maggiore esattezza a me possibile e con i mezzi fornitimi dal piccolo

laboratorio chirurgico dell'ospedale di Spoleto e con istrumenti avuti in prestito dai gentili colleghi prof. Rossi e dott. Piperno, che ringrazio di cuore.

Storia clinica.

Nel dicembre 1902 un operaio dello stabilimento, dopo aver terminato il proprio turno di lavoro, se ne tornò a mezzanotte a casa in perfetto benessere. Verso le tre del mattino si svegliò ed, emettendo un gemito di dolore e qualche rantolo, morì improvvisameute.

Per quanto i sospetti della causa della morte cadessero sul S^2C, la mancanza nella letteratura di ogni accenno in proposito a tale fine negli operai del cautciù obbligati a respirare le stesse esalazioni, in quantità maggiore che nello stabilimento, di cui mi occupo, attenuò il dubbio, e non si procedette alla necroscopia.

Due mesi più tardi si ripetè un altro caso del tutto simile al precedente ed allora, a scanso di responsabilità, ne feci avvisata l'autorità giudiziaria, quasi obbligandola ad una necroscopia d'ufficio, che fu fatta in mia presenza da due colleghi di Spoleto.

Benchè la ricerca fosse stata eseguita con la massima accuratezza, non fu possibile precisare la vera causa della morte, non avendo riscontrato nel cadavere alcuna lesione macroscopica apparente degli organi, ad eccezione di un cuore un po' ipertrofizzato nel miocardio, che era anche leggermente pallido; e del fegato un poco ingrandito e più chiaro.

Degli organi interni furon serbati pezzi per l'esame microscopico, che però l'autorità giudiziaria non fece mai eseguire.

Degno di nota erano l'avanzata putrefazione trenta ore dopo la morte, la scomparsa di ogni rigidità cadaverica, l'odore fetido simile a quello di S^2C e le bollicine di gas, che uscivano all'apertura delle cavità e specialmente della cranica.

Il risultato del *reperto necroscopico* dei periti giudiziari ammise solo che il S^2C potesse essere stato problematica causa della morte, avvenuta facilmente per sincope, riservandosi però di dare un giudizio più preciso dopo le ricerche microscopiche. In ogni modo il S^2C si poteva considerare come coefficiente della morte stessa per l'azione venefica di esso.

Le ricerche microscopiche non furono più fatte eseguire dall'autorità giudiziaria; solo io esaminai dei piccoli pezzi degli organi più importanti, ad eccezione del sistema nervoso centrale, ed ottenni i seguenti risultati:

Polmone: nulla d'interessante e di patologico.

Cuore: leggera infiltrazione grassa fra le fibre, che erano perfettamente integre, striate e nucleate.

Fegato: le cellule dei lobuli epatici erano granulose, nucleate al centro, di grandezza normale e non differenti da quelle di un fegato sano: non fu fatta la colorazione con acido osmico e quindi non si potè vedere l'estensione dell'infiltrazione e degenerazione grassa delle cellule, che però mostravano degli spazi vuoti, specialmente al centro dei lobuli.

Rene: normale.

Milza: normale.

Così anche il reperto microscopico non ci dette alcun lume sulla vera causa della morte dell'operaio. Si poteva però arguire dalle leggere lesioni macroscopiche e microscopiche che vi era stato assorbimento di S^2C e che esso poteva essere stato causa della leggera degenerazione grassa del cuore e del fegato.

Allora mi accinsi a studiare gli effetti del S^2C sull'organismo degli operai dello stabilimento, di cui ho parlato, e sugli animali da esperimento.

Osservazioni cliniche.

Rilevando che *quasi tutti gli operai dello stabilimento per l'estrazione dell'olio dalla sansa sono affetti da una cachessia*, simile alla cancerigna, alla palustre; da *frequenti disturbi intestinali e da anemia* più o meno gravi dopo un certo periodo di lavoro continuo e che un miglioramento evidentissimo si nota in essi dopo solo qualche settimana di riposo, in ciascuno ho portato la mia attenzione:

a) sullo stato generale, sugli organi e sulle funzioni di essi, specialmente di quelli della digestione;

b) sul sangue; e su questo tessuto, come quello che primo e più facilmente può subire alterazioni dalle sostanze gassose eterogenee all'organismo e specialmente se venefiche, le mie ricerche sono state più estese.

Esse sono state fatte su dodici operai, di cui cinque ancor giovani e da poco nello stabilimento, sette già adulti e da più di otto anni a lavorarvi. Alcuni di essi stanno a maggior contatto con le emanazioni gassose ed altri meno; ma tutti respirano i vapori di S^2C e ne risentono i danni. Le osservazioni, per quanto accurate, non poterono essere in tutti complete, perchè gli operai non si prestavano molto volontieri ai miei studi ed alcuni persino credevano che io li esaminassi per arrecare loro del male col far cessare i lavori nello stabilimento o per farli allontanare da esso, come non più idonei o non perfettamente sani; ed altri temevano anche il rimprovero del padrone dell'industria.

a) Stato generale. — Osservando gli operai che lavorano in quell'industria si nota in tutti un aspetto diverso dagli altri abitanti del paese. Tanto in quelli più anziani di lavoro, che nei più giovani si osserva la cute pallida, giallo-terrea, anche avvizzita nei più anziani di lavoro.

Le mucose labiali e gengivali sono pallide nei primi, rosso-vinose-scure nei secondi. La congiuntiva è in tutti rossa nella rima palpebrale, iniettata nel bulbo. Il pannicolo adiposo è scarso in coloro, che vi stanno da parecchio tempo e quasi scomparso nei più vecchi di lavoro, a cui la pelle si solleva in pliche dovunque, dando una fisonomia di vecchiezza inoltrata ad uomini ancor giovani.

Quest'aspetto fa impressione specialmente a coloro, che abbiano conosciuto gli operai prima dell'ingresso a quel lavoro, anche se trascorsi alcuni

mesi soltanto. Essi però ritornano al primitivo benessere dopo essersene allontanati pochi mesi se giovani: e solo migliorano, se abbandonano lo stabilimento dopo molti anni od a tarda età.

Al cambiamento della fisonomia corrisponde anche un'alterazione in meno od in più del peso del corpo a seconda che l'esame si faccia dopo un periodo di lavoro o dopo lungo riposo.

La muscolatura è discretamente nutrita e sviluppata nei giovani, denutrita specialmente negli operai adulti anche se non anziani di lavoro. In costoro anche il tono muscolare non è normale poichè i muscoli delle gambe e delle braccia allo stato di riposo sono dondolanti e rilasciati, ed in uno, che sta da più di 15 anni nello stabilimento, tale fatto va spesso unito a contratture, quasi spasmodiche, a mo' di crampi nei muscoli della gamba.

I movimenti attivi si compiono tutti completamente e non sono alterati in alcun modo nè nella coordinazione, nè nel rapporto con lo stimolo, nè vi sono movimenti involontari, come tremori od oscillazioni, fuorchè in un operaio bevitore, in cui si hanno tremori oscillatori delle mani, specialmente all'inizio dei movimenti.

La forza muscolare, misurata premendo e traendo il dinamometro con la mano è poco differente da quella degli altri operai della campagna; però in quelli si ha maggior differenza fra prima e dopo il lavoro e cresce dopo qualche giorno di riposo più che in questi.

I riflessi profondi sono normali in tutti, ad eccezione che in due, denutriti ed anziani, in cui sono un po' diminuiti i patellari; dei superficiali sono normali in tutti tanto i cutanei che i mucosi. Le pupille e gli altri sfinteri funzionano in tutti normalmente.

La sensibilità generale e dolorifica, misurata con correnti indotte, ci fa notare che il minimo della sensazione elettrica si percepisce in alcuni con correnti più intense che negli altri, specialmente se misurata alla faccia, però non è in rapporto con l'anzianità di lavoro: così l'intensità della corrente atta a produrre il primo segno di dolore non è molto differente fra gli operai dello stabilimento e i campagnuoli, fra i vari operai e durante il lavoro od il riposo. Si hanno però talvolta dei dolori muscolari localizzati alle coscie ed alle braccia, che gli operai dicono essere in rapporto con l'eccessivo lavoro, e che scompaiono con il riposo. Altre volte si ha cefalea specialmente quando gli operai sono destinati a ripulire la cupa od a lavorare, mentre nelle macchine vi sono perdite di gas. Non si hanno parestesie. La sensibilità termica e tattile corrispondono alla fisiologica. L'organo della vista è in tutti normale, fuorchè in due, che hanno più di 50 anni, nei quali si ha presbiopia. Tutti gli altri organi di senso specifici sono normali.

Il potere sessuale è in tutti normale. Le facoltà psichiche sono un po' tarde nei vecchi, e qualche volta dai giovani, benchè d'intelligenza perspicace e pronta, si prova un senso di stordimento, che va anche unito a quello di stanchezza e prostrazione, specialmente dopo lavori, che abbiano fatto respirare discrete quantità di gas S^2C.

Queste osservazioni sommarie sul sistema muscolare e nervoso, benchè non ci facciano vedere chiaro alcuno dei sintomi di avvelenamento, che l'Oliver (7) ha osservato nelle donne adibite alla lavorazione della gomma

elastica in Inghilterra, tuttavia ci mostrano che qualche disturbo temporaneo viene risentito anche dalla respirazione di minime quantità o di periodiche medie dosi di gas S^2C. La denutrizione muscolare nei più anziani di lavoro, la diminuzione della sensibilità generale ed il senso di stanchezza e di torpore psichico, possono essere facilmente dipendenti dal lavoro in quell'industria e quindi dalla respirazione del gas S^2C.

Organi interni. — All'esame degli organi toracici il polmone non lascia riscontrare alcuna anormalità ad eccezione che in due operai, di cui uno fu affetto da pleurite ed un altro, di 60 anni, con catarro bronchiale cronico.

L'esame del cuore non mostra nulla degno di nota all'ispezione; la percussione ci mostra l'area cardiaca un pochino estesa in tre operai, nulla negli altri; essa corrisponde all'ascoltazione ad indebolimento dei toni cardiaci alla punta, che si nota anche in altri tre, che stanno da molto nello stabilimento. Nei giovani si sente un leggero soffio anemico alla giugulare ed in un vecchio un soffio dolce in 1° tono, che quasi lo nasconde.

Il polso è in quasi tutti buono, elastico, non teso, nè frequente. Non si ha ateromasia, fuorchè in uno di 60 anni.

Nessuno degli operai si lamenta di oppressioni notturne, di affaticamento o dispnea o tachicardia nel sollevare pesi, o nel fare ascensioni.

All'esame degli organi addominali in tutti si nota ventre tumido, non dolente, meteorico, contrastante con l'emaciazione generale. In cinque su dodici operai esaminati gastroectasia da raggiungere quasi l'ombelico, dopo il gonfiamento dello stomaco con le polveri del Frerichs. La milza sorpassa i limiti normali in 4 dei più anziani, sino a raggiungere l'11° spazio, ed in uno a sentirsi sotto l'arcata costale; il fegato sembra nei limiti fisiologici a bordi netti taglienti, il colon ed il tenue si sentono rigonfi. Mentre però le lesioni degli organi addominali sono poco importanti ed appariscenti all'esame fisico, le alterazioni funzionali sono di una certa entità.

L'alito fetido, la lingua impaniata od un senso di amarezza, che spesso notano gli operai, le eruttazioni dell'odore di uova fradicie, unite a frequenti emissioni di gas dal retto ed a qualche diarrea, ci mostrano che la respirazione del gas S^2C altera in qualche modo le funzioni digestive. Talvolta alcuno degli operai è stato colto da dolori con vomito alimentare e biliare, specialmente quando più intenso era stato l'assorbimento di S^2C, dandoci evidente dimostrazione dell'irritazione prodotta da esso sull'intestino e sulle sue glandule.

Il meteorismo, le diarree, come l'ectasia gastrica, si potrebbero attribuire all'alimentazione cattiva, insufficiente, ingombrante, ma gli altri fatti e specialmente la coincidenza con l'intenso assorbimento di S^2C le fa mettere in relazione con questo: per meglio conoscere però la causa di tali alterazioni funzionali e la loro importanza ho cercato di determinare il potere motorio, digestivo ed assimilativo in due degli operai, che mostravano maggiore alterazione organica e più frequenti disturbi intestinali che gli altri; ed ho trovato che, facendo ingerire in ostia un grammo di salolo ed esaminando, dopo una mezz'ora, le urine, di 5 in 5 minuti, la colorazione di esse in violetto con l'aggiunta di percloruro di ferro si notò

tra un'ora e 10' ed un'ora e 20', dandoci a vedere una motilità normale. Così somministrando centgr. 20 di IK la reazione bleu sulla salda d'amido nella saliva si notò dopo 18 o 20 minuti, mostrandoci non molto alterato il potere assorbente dello stomaco. Il sondaggio di questo, fatto un'ora dopo l'ingestione di una zuppa in brodo di manzo, che, se non era, rassomigliava molto al pasto di Ewald, ci dette in uno circa 60 cmc. di filtrato, in cui si notò la reazione rossa dell'HCl con il reattivo di Günzburg e con la carta preparata alla tropeolina OO; appena tracce di acido lattico; nell'altro la sonda estrasse circa 90 cmc. di liquido che mostrò le stesse reazioni e che dopo averlo filtrato intaccò un cubetto di albumina d'uovo, di cmc. 1, per quasi la metà in 12 ore alla temperatura di 26° circa. Appena estratto, il liquido in ciascuno dei due operai aveva odore leggero di uova fradicie, che però presto scomparve.

L'esame chimico delle urine fatto più volte, prendendole durante il lavoro, o dopo più giorni di riposo in tutti gli operai non mi dette alcuna traccia di sostanze patologiche, cioè albumina, zucchero, fosfati in eccesso. I cristalli di nitrato d'urea, evaporando l'urina dopo aggiunta di acido nitrico, si formavano regolarmente. Nulla all'esame microscopico del sedimento; non cilindri, non elementi epiteliali, nè pus od emazie. Solo gli urati erano in eccesso nei più anziani, ed in uno si notavano filamenti di muco e qualche elemento vescicale; ma l'individuo aveva sofferto di un catarro della vescica dovuto a leggera ipertrofia della prostata. L'esame di questi operai fu ripetuto dopo alcuni mesi di riposo (da 1 a 5) e si notò quanto segue:

Se si toglie un vecchio di 62 anni rimasto sempre debole e deperito, le condizioni generali degli altri operai si mostrano molto migliorate: il colorito tornato normale, l'aspetto abbastanza florido, invariate le condizioni del cuore, migliorati i disturbi intestinali, pur rimanendo la ectasia gastrica ed il leggero tumore di milza.

Dalla storia di ciascun operaio cercai studiare *il rapporto di questo lavoro pericoloso e dannoso alla salute con le varie infezioni e ricettività alle malattie*; ma non potei avere alcun risultato positivo.

Degli operai vecchi, che lavoravano nello stabilimento da circa 18 anni, uno solo soffrì un'infezione pneumonica, che ebbe un esito buono ed un decorso comune, senza strascichi e complicazioni. Degli altri, due ebbero a soffrire, dopo qualche anno di lavoro nello stabilimento, un'infezione tifoidea, che decorse con febbre leggera e senza complicanza di sorta.

Le enteriti, enterocoliti con febbre di pochi giorni, o senza febbre, con diarrea frequente, tenesmo e dolori si sono avute da un giovane operaio tre volte, da tre altri una, e da un quinto due; ma solo nel 1° caso si ebbero scariche sanguinolenti e sempre si manifestarono nell'estate, avendo quindi rapporto anche con l'alimentazione e stagione. Nemmeno da altri, che lavorarono nello stabilimento nei primi tempi del suo sorgere e che poi abbandonarono, si ebbero a lamentare malattie, che venissero attribuite alla permanenza in esso, o per esso rese più gravi. Anzi il ministro dell'industria, che spesso durante la giornata passa del tempo nel fabbricato dello stabilimento e che abita assai vicino ad esso, tanto da sentire l'odore delle emanazioni gassose di S^2C anche dalle camere, quando le finestre sono aperte, ebbe una pleurite fibrinosa tubercolare con emottisi

e localizzazioni specifiche all'apice destro, da cui è guarito, pur stando sempre nella sua abitazione, facendo però uso abbondante di sali di guaiacolo e di alimentazione buona e sana.

Il S^2C può considerarsi invece, non coefficente, ma causa diretta delle passeggiere coliche intestinali, a cui parecchi operai più volte sono andati soggetti, specialmente quando erano costretti a ripulire la cosidetta cupa, dove si trattenevano a lungo, senza alcuna precauzione; o quando avveniva per imperizia, poca serveglianza o negligenza, qualche fuga; o quando un lavoro eccessivo non dava tempo alle ultime tracce di S^2C ad essere trasportate via dal vapore acqueo. Nell'estate e nell'inverno accadevano più spesso tali disturbi, forse anche per influenza della stagione.

b) Ricerche ematologiche. — Le mie ricerche furono più estese sul sangue, come quello che facilmente deve risentire l'influenza dell'assorbimento del S^2C La cachessia, a cui gli operai vanno soggetti in quello stabilimento, lo stato anemico, che presto li colpisce, richiamarono la mia attenzione su tale tessuto dell'organismo, tanto più chè ricerche, per quanto ne sappia, assai ristrette sino ad oggi sono state fatte su esso.

Invero lo Iaks (8) ne dà qualche accenno. Richiamando le osservazioni di tossicologi, l'autore parla dell'anemia grave, che si osserva negli operai delle fabbriche del cautciù, e la crede in dipendenza dello sfacelo dei corpuscoli rossi del sangue, per l'assorbimento di S^2C, e delle enteriti frequenti, a cui gli operai vanno soggetti.

Il Delpek (9) nelle « Mémoires sur les acides, ecc. » dice solo che il S^2C produce un'anemia, che poi è causa di molti altri disturbi, osservati negli individui costretti ad un continuo assorbimento di S^2C.

Il Laudenheimer (10) nel « Die Schwefelkohlenstoffvergiftung der Gummiarbeiter » parla solo dei sintomi clinici dell'avvelenamento per S^2C e quindi delle alterazioni della crasi sanguigna, solo come esponente di quelli. Così Hermann e Kobert (11), benchè più diffusamente trattino delle conseguenze, che produce nell'organismo il S^2C assorbito in grande quantità od in minime dosi e continuamente, non parlano delle alterazioni del sangue.

Le mie ricerche quindi sono state più estese su questo liquido, approfittando di tutti quei dati, che mi potevano dare qualche lume sull'argomento.

Raggruppati gli operai fra loro a seconda dell'età e del tempo che stavano a lavorare in quell'industria ho fatto le varie ricerche in tre periodi:

I. Dopo più giorni di lavoro continuo (da 50 a 120).

II. Dopo più settimane di riposo (da 2 a 4).

III. Dopo più mesi di allontanamento dal lavoro (da 2 a 5).

Ho studiato di pormi sempre nelle stesse condizioni di circostanze in ogni ricerca, tenendo conto dei fatti, che avrebbero potuto alterare le cifre; ed ho cercato anche di porre la massima accuratezza nel dare la media delle osservazioni.

Esse sono state:

1° La ricerca della ricchezza di Hmb coll'apparecchio del Fleisch.

2° La numerazione delle emazie con l'apparecchio del Thoma-Zeiss pungendo il polpastrello di un dito con lancetta Laker.

3° La numerazione dei leucociti con lo stesso apparecchio.
4° Il rapporto fra le emazie ed i corpuscoli bianchi.
5° Il valore globulare.

Con questi dati ho potuto determinare il grado di *anemia* dei vari operai, dopo un lungo periodo di lavoro e quindi di lento e continuo assorbimento di S^2C; il vantaggio che la crasi sanguigna risentiva da un riposo di qualche settimana; le differenze nei vari valori, dopo l'abbandono del lavoro per qualche mese.

6° Era poi per me interessante sapere quale era l'alcalinità del sangue e se essa era diminuita per l'assorbimento di S^2C.

Per questa ricerca mi studiai di seguire il metodo del Landois (12), adoperando dieci miscele graduate di una soluzione al 7,5 %, di acido tartarico ed un'altra satura di SO^4Na^2. Sperimentando le miscele con sangue di persona sana, determinai l'alcalinità del sangue dell'uomo, che trovai uguale a quella data dall'illustre fisiologo: la carta cominciava ad arrossarsi alla V od alla VI soluzione.

7° Seguendo poi le moderne ricerche sulla resistenza dei corpuscoli rossi, da me anche altra volta studiata nel laboratorio della regia Clinica dermosifilopatica di Roma e resa nota nella *Riforma Medica* del XVI anno e negli Atti della regia Accademia medica di Roma del 1901 (13), ho voluto dare ai miei studi un indirizzo nuovo, bene indicato dal Mosso (14), dal Viola (15) e dall'Hamburger (16), adoperando soluzioni di ClNa al di sotto della isotonica.

Nelle mie ricerche ho posto attenzione nel determinare ciò che il Viola chiama *resistenza massima*, *media* e *minima* dei corpuscoli rossi.

Per ottenere questi dati il Viola fa 24 soluzioni di ClNa, crescenti di 2 centigrammi ciascuna (da 0.20 a 0.68 %), pone in provette di diametro uguale (cm. 1 di diametro e 10 di altezza), 8 cm^3 di soluzione, a cui aggiunge 2 grosse goccie di sangue estratto da una vena con una siringa Banfi.

La *resistenza media* (R^2) è data dall'osservazione immediata a luce trasmessa (per trasparenza) della provetta, che mostra un leggero intorbidamento e che segue alle provette limpide, ma tinte in roseo dall'Hmb. Per il sangue normale si ha alla soluzione 0.38 % di ClNa.

La *resistenza minima* (R^3) si può vedere dopo tre ore; è data dalla provetta rimasta limpida ed incolore, dopo l'avvenuta sedimentazione dei corpuscoli e per il sangue normale si ha alla soluzione 0.48 di ClNa.

La *resistenza massima* (R^1), seguendo il metodo indicato dal Piperno (17), si ottiene con la numerazione delle emazie con l'apparecchio Thoma-Zeiss, dopo aver diluito il sangue 1 : 100 con soluzione di ClNa 0.32 %, che dal Viola (18) è indicata come quella, che ci mostra i globuli più resistenti nel sangue normale. I globuli rossi di resistenza massima in questa soluzione raggiungono il numero di 15 mila circa per mmc. nel sangue di uomo sano. Il loro rapporto con tutte le emazie è detto poi *rapporto di resistenza massima* (Rap R^1) ed è uguale nel sangue normale a 3 : 1000. Con questi 4 dati ho studiato l'azione del S^2C sugli elementi viventi del plasma sanguigno e sugli organi ematopoietici, come si leggerà in appresso.

8° In preparati a fresco su vetrino piatto ed in goccia pendente ho fatto l'esame del sangue per vedere se si otteneva qualche alterazione nei corpuscoli dopo lungo assorbimento di S^2C.

9° Infine ho studiato, se al microscopio si notavano differenze fra il sangue degli operai in esame e quello di uomo che lavora all'aperto; fra lo stesso sangue durante il lavoro nello stabilimento, dopo breve o lungo riposo, previa fissazione su coprioggetti e colorazione con bleu di metilene ed eosina, ed ho cercato di vedere se nei preparati le emazie mostravano alterazione del potere fissatore dell'O^2.

I. — B. C....., operaio che sta molto in contatto con emanazioni lente ed accidentali fughe di S^2C: ha 50 anni e lavora da 20 nell'industria. Non ebbe che una sola volta sintomi di avvelenamento acuto; ma soffre spesso di diarree e dolori intestinali.

Esame del sangue.

	Dopo mesi 2 ½ di lavoro	Dopo 16 giorni di riposo	Dopo 3 mesi di riposo
	—	—	—
Hmb	38	46	68
Emazie	3,000,000	3,200,000	3,900,000
Leucociti	12,000	13,000	10,000
Rap. leuc. em.	1 : 250	1 : 250	1 : 350
V. gl.	0.63	0.70	0.80
Alcalinità	IV-III	IV	V
G. R^1 (0.32)	100,000	60,000	40,000
Rap. R^1	33 : 1000	19 : 1000	10 : 1000

II. — B. V..., ha 60 anni e sta da 14 nell'industria. E' di costituzione fisica debole, ed è costretto ad una vita di sacrifici. Ha, nello stabilimento, l'ufficio del precedente.

Esame del sangue.

	Dopo 56 giorni di lavoro	Dopo 18 giorni di riposo	Dopo 3 mesi di riposo
	—	—	—
Hmb	38	40	55
Emazie	3,000,000	3,100,000	4,000,000
Leucociti	12,500	15,000	15,000
Rap. leuc. em.	1 : 250	1 : 200	1 : 265
Valore globulare	0.63	0.64	0.68
Alcalinità	III	IV	V
R^1 (0.32)	100,000	60,000	40,000
Rapp. R^1	26 : 1000	19 : 1000	10 : 1000
R^2	0.38; 0.40	—	—
R^3	0.52	—	—

III. — M. G..., d'anni 50. Lavora da 14 anni nello stabilimento, ed è adibito a lavori, che facilmente lo espongono a respirare vapori di S^2C.

Esame del sangue.

	Dopo 2 mesi di lavoro	Dopo 2 settimane di riposo	Dopo 3 mesi di riposo
Hmb	46	46	56
Emazie	4,000,000	4,000,000	4.200,000
Leucociti	13,000	14,000	12,000
Rap. leuc. em	1 : 340	1 : 290	1 : 330
V. gl.	0.59	0.59	0.66
Alcalinità	III-IV	III-IV	IV-V
G. R^1 (0.32)	100,000	64,000	30,000
Rap. R^1	25 : 1000	16 : 1000	9 : 1000
R^2	0.36	—	—
R^3	0.50	—	—

IV. — A. G..., d'anni 49. Sta nello stabilimento da 16 anni; è macchinista e direttore pratico ed ha minori contatti dei precedenti operai con le emanazioni gassose di S^2C.

Esame del sangue.

	Dopo 70 giorni di lavoro	Dopo 18 giorni di riposo	Dopo 3 mesi di riposo
Hmb	49	58	69
Emazie	3,800,000	4,000,000	4,000,000
Leucociti	14,000	14,000	13,000
Rap. em. leuc	1 : 270	1 : 290	1 : 330
Val. gl.	0.68	0.69	0.70
Alcalinità	IV	V	V
R^1 (0.32)	58,000	52,000	50,000
Rap. R^1	16 : 1000	13 : 1000	11 : 1000

V. — D. C..., d'anni 40. Sta da circa 7 anni nello stabilimento ed è costretto a respirare spesso aria mista a vapori di S^2C. Durante il riposo compie altri lavori faticosi.

Esame del sangue.

	Dopo 3 mesi di lavoro	Dopo 23 giorni di riposo	Dopo 68 giorni di riposo	Dopo 1 mese di ripresa dei lavori e cura ferruginosa arsenicale
Hmb	62	64	70	68
Emazie	3,800,000	3,900,000	4,400,000	4,000,000
Lencociti	12,500	12,250	13,000	13,800
Rap. leuc. em.	1 : 300	1 : 310	1 : 300	1 : 345
V. gl.	0.80	0.80	0.79	0.81
Alcalinità	IV	IV	IV	III-IV
Gl. R^1 (0.32)	60,000	60,000	40,000	50,500
Rap. R^1.	16 : 1000	15 : 1000	9 : 1000	12 : 1000
R^2	0.36	—	—	0.36
R^3	0.46	—	—	0.50

VI. — S. V....., d'anni 32. Lavora da 4 anni nello stabilimento e sta poco in contatto diretto con le emanazioni gassose. Si nutre assai bene.

Esame del sangue.

	Dopo 3 mesi di lavoro	Dopo 12 giorni di riposo	Dopo 4 mesi di riposo
Hmb	65	78	70
Emazie	4,500,000	4,600.000	4,600.000
Leucociti	14,000	12.000	13,100
Rap. leuc. em....	1 : 320	1 : 380	1 : 350
V. gl.	0.73	0.84	0.76
Alcalinità	IV	VI	V
Gl. R^1 (0.32)	130,000	48,000	49,500
Rap. R^1..........	29 : 1000	10 : 1000	11 : 1000
R^2	0.36	0.36	...
R^3	0.48	0.50	...

VII. — L. D....., d'anni 25. Lavora da circa due anni nella fabbrica, fa il facchino ed è costretto ad una vita di sacrifici e privazioni.

Esame del sangue.

	Dopo 3 mesi di lavoro	Dopo 20 giorni di riposo	Dopo 100 giorni di riposo
Hmb	46	55	70
Emazie	4,750,000	4,900,000	4,800,000
Leucociti	16,000	16,000	15,000
Rap. leuc. em.....	1 : 310	1 : 300	1 : 320
V. gl.	0.50	0.56	0.72
Alcalinità	IV	V	VI
Gl. R^1 (0.32)	90,000	50,000	20,000
Rap. R^1..........	19 : 1000	10 : 1000	5 : 1000

VIII. — L. F....., d'anni 27. Robusto, lavora come macchinista e direttore pratico dell'industria. Ha però occasione di assorbire spesso i vapori di S^2C. Non è mai andato soggetto ad intossicazioni acute; ma ha sofferto leggeri e frequenti disturbi intestinali.

Esame del sangue.

	Dopo 2 mesi di lavoro continuo	Dopo 17 giorni di riposo	Dopo 98 giorni di riposo
Hmb	68	80	82
Emazie	4,500,000	5,100,000	5,200,000
Leucociti	17,000	16,000	16,000
Rap. leuc. em.....	1 : 265	1 : 340	1 : 310
V. gl.	0.75	0.78	0.79
Alcalinità	IV	V	V
Gl. R^1 (0.32)	120,000	35,000	30,000
Rap. R^1	28 : 1000	7 : 1000	5 : 1000

IX. — S. E....., d'anni 28. Lavora nell'industria da circa due anni, ma a più riprese. Sta molto a contatto con le emanazioni di S^2C.

Esame del sangue.

	Dopo 3 mesi di lavoro	Dopo 12 giorni di riposo	Dopo 3 mesi di riposo
Hmb............	55	62	70
Emazie...........	4,000,000	4,100.000	4,100,000
Leucociti.........	16,000	16,000	14 000
Rap. leuc. em....	1 : 250	1 : 260	1 : 300
V. gl............	0.68	0.74	0.84
Alcalinità.........	IV	V	V
Gl. R^1 (0.32).....	128,000	64,000	19,000
Rap. R^1..........	32 : 1000	15 : 1000	5 : 1000

X. — R. P....., d'anni 29, robusto e conosciuto da me prima che entrasse a lavorare nello stabilimento. Dopo 4 mesi diventò pallido terreo, emaciato e cominciò a soffrire qualche disturbo intestinale. Abbandonò il lavoro per timore di sofferenze maggiori.

Esame del sangue.

	Dopo 4 mesi di lavoro	Dopo 15 giorni di riposo	Dopo 5 mesi dall'abbandono del lavoro
Hmb............	46	60	78
Emazie...........	4,000,000	4,300,000	4,800,000
Leucociti.........	12,500	13,500	13,100
Rap. leuc. em....	1 : 290	1 : 310	1 : 366
V. gl............	0.58	0.69	0.81
Alcalinità........	V	IV-V	IV
Gl. R^1 (0.32).....	122,000	70,000	14,000
Rap. R^1..........	31 : 1000	15 : 1000	3 : 1000

XI. — B. B....., d'anni 36. Lavora da 10 anni nell'industria. Ha sofferto più volte disturbi intestinali; non ha gran contatto con le emanazioni di gas.

Esame del sangue.

	Dopo 78 giorni di lavoro	Dopo 16 giorni di riposo	Dopo 3 mesi di riposo
Hmb............	55	62	82
Emazie...........	4,000,000	4,000,000	4,600,000
Leucociti.........	12,000	10,000	13,000
Rap. leuc. em.....	1 : 290	1 : 400	1 : 320
V. gl............	0.68	0.77	0.78
Alcalinità........	IV	IV	V
Gl. R^1 (0.32).....	39,000	36,000	20,000
Rap. R^1..........	10 : 1000	9 : 1000	6 : 1000
R^2..............	38	38	...
R^3..............	50	48	...

XII. — F. V....., d'anni 50. Sta da 6 anni nello stabilimento e sorveglia l'estrazione dell'olio nei cilindri. Si nutre insufficientemente e vive in condizioni igieniche cattive.

Esame del sangue.

	Dopo 3 mesi di lavoro continuo	Dopo 25 giorni di riposo	Dopo 100 giorni di riposo	Un mese dopo la ripresa dei lavori e cura di Fe e As
Hmb	55	60	65	60
Emazie	3,700,000	3,900,000	4,000,000	3,800,000
Leucociti	10,000	12,000	10,000	12,000
Rap. em. leuc.	1 : 370	1 : 310	1 : 400	1 : 310
V. gl.	0.74	0.77	0.82	0.79
Alcalinità	III	IV	IV	III
Gl. R^1 (0.32)	80,000	70,000	68,000	70,000
Rap. R^1	23 : 1000	19 : 1000	13 : 1000	18 : 1000

Esaminando le cifre ottenute nei vari esami dei 12 operai si nota:

1° Che, dopo un lavoro continuo di qualche mese (da 2 a 4), per un orario di 12 ore a turno, anche di notte, senza il riposo settimanale, la quantità di Hmb, misurata con l'emometro di Fleischl, è diminuita molto dalla media fisiologica, raggiungendo un minimo di 38 ed un massimo di 68 (n. I e II). La diminuzione è poi maggiore in quegli operai, che, come nel II e VII, al lavoro in quello stabilimento uniscono una vita di sacrifici ed una nutrizione insufficiente ed anche in quelli, che molto stanno a contatto con le continue emanazioni gassose (I e III); ed in quelli, che per la prima volta lavorano in quell'industria (X). La quantità di Hmb però risale subito, se si sospende il lavoro in quell'ambiente e, già dopo 15 o 20 giorni, al più, aumenta del 4 al 15 per cento e più in coloro, che meglio degli altri si possono nutrire, o sono più giovani e più robusti. Dopo un riposo poi di alcuni mesi (da 3 a 5), noi osserviamo un maggiore aumento della quantità di Hmb, che raggiunge nei più forti ed in coloro, che per il loro lavoro non avevano assorbito continuamente i vapori di S^2C, la media fisiologica ed anche la sorpassa. In quegli operai però, che stanno da molti anni in quell'industria, la quantità di Hmb rimane sempre al disotto del normale (II, III, V e XII), specialmente se la nutrizione è insufficiente.

2° Contemporaneamente all'Hmb diminuisce il numero delle emazie di circa un milione in media, con un massimo di due milioni nei denutriti. nei vecchi e nei più anziani di lavoro, (I, II, XII), ed un minimo di circa 600 mila nei più giovani ed in coloro, che stanno meno a contatto con le emanazioni gassose ed hanno un discreto

salario. Benchè il numero delle emazie con il riposo di pochi giorni aumenti meno che l'emoglobina, tuttavia ciò si verifica in tutti dopo due sole settimane di abbandono del lavoro, eccetto che nel III e IV, e varia da 100 a 300 mila. Dopo più mesi di riposo poi la cifra raggiunge in tutti, e sorpassa anche in alcuni i 4 milioni. L'aumento è maggiore in coloro, in cui la diminuzione era stata elevata per il lavoro. In due soltanto si ebbe diminuzione di qualche poco dall'osservazione antecedente, forse perchè gl'individui, che lasciarono lo stabilimento, si recarono ai lavori faticosi della mietitura.

3° Le cifre dateci dall'emometro e dal globulimetro acquistano poi maggior valore, se paragonate fra loro: cioè se si considera il *valore globulare* (V. G). Esso è bassissimo durante il lavoro ed in quelli che non si sono abituati a quell'ambiente, benchè giovani (VII e X) o stanno molto a contatto con le emanazioni di gas; è più alto in coloro, che, pur giovani, stanno per il loro lavoro non continuamente nell'interno della fabbrica (VIII); sta poi in rapporto diretto con la nutrizione e l'età.

Ciò dipende dall'assorbimento lento di S^2C, perchè col riposo il valore globulare cresce rapidamente e molto più nei giovani che nei vecchi, benchè nei primi l'abbassamento durante il lavoro sia stato più forte.

Questo fatto ci mostra che le emazie nei giovani risentono l'azione dei vapori di S^2C più intensamente, che quelle di coloro, che sono abituati a quell'ambiente; e che i corpuscoli rossi nei giovanni hanno maggior potenza di fissare il ferro che nei vecchi, nei quali il lavoro debilitante ha reso più difficile e sempre incompleta la *restitutio ad integrum* dei tessuti lesi.

4° Le cifre dateci dai leucociti, e dal loro rapporto con le emazie non sono molto variate dalla media fisiologica: talvolta l'una e l'altra cifra sono aumentate, tal'altra diminuite e poco variano col riposo o col lavoro. Nei giovani e nei vecchi, in coloro, che stanno più facilmente esposti a respirare vapori di S^2C, non si ha alcun dato, che abbia qualche importanza per trarne conseguenze, anche perchè il variare di queste cifre può essere in dipendenza di fatti fisiologici giornalieri (ad es. digestione).

5° L'alcalinità del sangue è diminuita in tutti gli operai: la carta di laccamuffa si arrossa spesso alla III ed alla IV miscela del Landois, invece che alla V, e maggiore è la diminuzione in quegli operai, che, più degli altri, sono obbligati a respirare le emanazioni di gas e nei più vecchi, nei quali poi, anche dopo lungo riposo, non si ha il ritorno alla media fisiologica. In due operai (VI e X), essa

dopo essere aumentata con un paio di settimane di riposo, torna ad essere bassa nell'osservazione fatta dopo tre mesi. Essi però al momento dell'esame erano di ritorno da faticosi lavori ed uno aveva compiuto anche un lungo viaggio.

6° Il numero delle emazie resistenti alla soluzione 0.32 di ClNa supera moltissimo la media data dal Piperno (19), poichè da 15 mila si giunge sino a 130 mila, durante il lavoro. La cifra è poi più alta in quegli operai, che da poco stanno nello stabilimento e che quindi sembrano risentire più l'azione del gas velenoso; è più bassa, ma sempre duplicata, in coloro, che stanno da anni a quel lavoro. Però con il riposo diminuisce subito, senza tornare, nemmeno dopo qualche mese, alla normale, fuorchè in due (X, XI), che, per avere abbandonato lo stabilimento, furono esaminati dopo cinque mesi di lavori campestri. Con il numero varia corrispondentemente il *rapporto globulare di resistenza massima.*

7° La *resistenza media* e *minima*, osservata con il metodo del Viola semplificato, giacchè, invece di adoperare provette ben calibrate, furono prese quelle comuni e di calibro presso che uguale, non mi dà diritto a conclusioni. Gli operai male si assoggettavano all'estrazione di sangue con una siringa e quindi le osservazioni furono poche e poco da esse si può dedurre. Noto solo che la *resistenza minima* è un pochino aumentata durante il lavoro.

8° A due operai (V da qualche anno nello stabilimento, XII da alcuni mesi) ho voluto esaminare il sangue dopo il lavoro di alcune settimane, durante le quali essi facevano una cura ricostituente di Fe ed As. In essi si è avuta una diminuzione dell'Hmb e delle emazie, ma il valore globulare è rimasto molto alto, benchè leggermente diminuito. L'alcalinità era minore, i globuli di R^1 erano in minor numero, che nell'esame fatto durante il primo periodo di lavoro, quando cioè non facevano la cura ricostituente, mostrandoci l'osservazione un certo effetto benefico dei rimedi, anche quando sostanze velenose vengano a contatto col sangue.

9° L'esame microscopico a fresco del sangue degli operai, fatto sia in vetrini piatti, che in goccia pendente, dopo allungamento con soluzione fisiologica di ClNa, non fece notare alcunchè di anormale nè durante il lavoro, nè dopo il riposo.

10. I preparati di sangue a secco, fissati e numerati per riconoscerli, vennero tutti esaminati previa colorazione con eosina gialla e bleu di metilene, fatta in tutti nello stesso tempo. Essi furono confrontati con preparati di persona sana e tra loro, però non si notò differenza alcuna fra il sangue colorato degli operai in esame

e dell'uomo sano, nè fra i preparati di sangue preso dopo lunga permanenza nello stabilimento e dopo l'allontanamento da esso per un tempo più o meno lungo.

11. Alcuni anni or sono il Blasi (20) nella regia Clinica dermosifilopatica di Roma osservò che il sangue seccato e fissato sopra un porta-oggetti, se immerso in acqua ossigenata, prima della colorazione con anilina, si colora assai più intensamente di quello che non abbia subìto tale processo. Approfittando di questa osservazione, io volli vedere se le emazie di quegli operai avevano perduto la proprietà di fissare l'O^2 od almeno l'avevano diminuita per l'azione continua del S^2C sul sangue; però non potei notare differenza in tale osservazione fra il sangue degli operai dello stabilimento e di altro uomo.

12. Volli anche vedere se i vapori di S^2C diminuivano il potere fissatore dell'O^2 nel sangue, già essiccato su porta-oggetti. A ciò esposi alcuni preparati di sangue, fissato su porta-oggetti, a vapori di S^2C e poi l'immersi in H^2O^2 e quindi ne feci la colorazione. Confrontandoli con altri non esposti ai vapori di S^2C, ma ugualmente colorati ed ossidati, si notò una colorazione leggermente meno intensa dei preparati esposti ai vapori di S^2C. La differenza però non fu sempre evidente.

13. Il Craus (21) trovò che il S^2C, come CO^2 e CO, ritarda la coagulazione del sangue. Estratta quindi una certa quantità di sangue ad un operaio dello stabilimento (V°) da una vena con la puntura di una lancetta da salasso, la lasciai coagulare entro una provetta e misurai il tempo necessario alla piccola massa per divenire compatta. Confrontai questo tempo con quello necessario per il sangue, estratto nelle stesse condizioni e con le stesse modalità dal braccio mio, ma non potei notare differenze.

IV. — **Ricerche sperimentali.**

Le poche osservazioni sugli operai furono confortate da esperimenti su animali.

Di quattro conigli, quasi uguali per età, peso e nutrizione, appartenenti allo stesso allevamento, due ne posi in una gabbia in un ambiente chiuso, dove da una bottiglia evaporava il solfuro di carbonio; gli altri furono posti in altro ambiente ed a tutti fu dato lo stesso alimento. Gli esami e le osservazioni su di essi furono eseguiti in quattro tempi: 1° prima dello esperimento; 2° dopo 12 giorni, 3° dopo 25, 4° dopo 3 mesi.

Indicando con *A* e *B* i conigli posti nell'ambiente, dove si sprigionavano i vapori di S^2C, e con *a* e *b* i conigli di controllo, si ebbero i seguenti risultati:

Esame prima dell'esperimento.

	Coniglio *A*	Coniglio *B*	Coniglio *a*	Coniglio *b*
Peso	1250	1300	1280	1300
Hmb.	105	110	110	108
Emazie	2,400,000	2,400,000	2,300,000	2,400,000
Leucociti	10,000	9000	10,500	7200
Rap. em. leu.	1 : 210	1 : 260	1 : 210	1 : 300
Val. gl.	0.99	1.03	1.05	0.99
Alcalinità	III	III	III	II
G. R^1 (0.32)	9600	11,000	8000	9000
Rap. R^1	3.5 : 1000	4.6 : 1000	3.8 : 1000	4.1 : 1000
R^2 (?)	0.30	0.36	0.36	0.34
R^3 (?)	0.46	0.40	0.40	0.42

Osservazioni eseguite dopo aver tenuto i conigli A *e* B *nell'ambiente ricco di vapori di S^2C ed i conigli* a *e* b *all'aria aperta per controllo, nutrendoli con lo stesso cibo.*

	Coniglio *A*	Coniglio *B*	Coniglio *a*	Coniglio *b*
Peso	1000	1100	1400	1350
Hmb.	90	96	110	106
Emazie	2,200,000	2,300,000	2,500,000	2,600,000
Leucociti	10,000	9500	7500	9100
Rap. em. leu.	1 : 220	1 : 265	1 : 350	1 : 300
Val. gl.	0.96	0.97	1.05	0.94
Alcalinità	II	II	III	IV
G. R^1 (0.32)	20,000	30,000	8000	12,000
Rap. R^1	10 : 1000	14 : 1000	3.7 : 1000	6 : 1000
R^2	32	34	34	34
R^3	44	44	40	42

Osservazioni eseguite dopo altri 12 giorni (25° dall'inizio dell'esperimento). Il coniglio b*, dopo alcuni giorni di malattia, il 19° morì per gregarinosi che aveva invaso fegato e milza.*

	Coniglio *A*	Coniglio *B*	Coniglio *a*	Coniglio *b*
Peso	980	1000	1360	Morto per malattia infettiva (gregarinosi)
Hmb.	85	92	112	
Emazie	2,000,000	2,250,000	2,500,000	
Leucociti	10,000	9600	7000	
Rap. em. leu.	1 : 200	1 : 200	1 : 360	
Val. gl.	0.95	0.96	1.06	
Alcalinità	II	II	III	
G. R^1 (0.32)	23,000	28,000	8000	
Rap. R^1	12 : 1000	13 : 1000	4 : 1000	
R^2	34	32	32	
R^3	44	46	42	

Osservazioni eseguite sui tre conigli 56 giorni dopo la precedente (90° dallo inizio dell'esperimento). Gli animali vengono quindi uccisi.

	Coniglio *A*	Coniglio *B*	Coniglio *a*
Peso	980	990	1400
Hmb.	85	90	112
Emazie	2,100,000	2,150,000	2,500,000
Leucociti	9500	10,000	8000
Rap. em. leu.	1 : 210	1 : 190	1 : 360
Val. gl.	0.95	0.95	1.08
Alcalinità	II	II	III
G. R^1 (0.32)	26,000	26,000	9800
Rap. R^1	13 : 1000	12 : 1000	5 : 1000
R^2	32	34	32
R^3	44	44	40

Le cifre segnate nelle tabelle si possono considerare abbastanza esatte, perchè rappresentano la media di 3 o 4 osservazioni ciascuna. Da esse si rileva che:

I conigli tenuti nell'ambiente ricco di vapori di S^2C diminuirono di peso benchè nutriti come quelli di confronto, e l'emaciazione fu continua e progressiva, mentre gli altri aumentarono; uno solo poi diminuì per morire di gregarinosi, come si vide dalla necroscopia.

L'emoglobina anche diminuisce nei primi e non nei secondi e progressivamente per quattro settimane; poi resta invariata, mentre in quello di confronto aumenta e rimane sempre elevata.

Con l'emoglobina nei conigli *A* e *B* diminuiscono le emazie, il valore globulare, l'alcalinità, benchè questa sia appena di un grado delle soluzioni. Non si ha ciò nel coniglio di controllo *a*.

I leucociti restano invariati, ma il rapporto con le emazie, il cui numero è diminuito, cresce nei conigli esposti all'assorbimento di S^2C.

I globuli di resistenza massima (R^1) sono aumentati nei primi e restano quasi invariati in quello di confronto.

In quelli aumentò anche il rapporto dei globuli di resistenza massima con le emazie (Rap. R^1).

Sui valori della resistenza media (R^2) e la resistenza minima (R^3) non si può fare alcuna deduzione, avendo ottenuto cifre varie.

Goccioline di sangue, allungato con soluzione 0.75% di Na^2Cl, furono fissate in ogni osservazione su vetrini coprioggetti, che si numerarono per riconoscerli. Quindi tutti contemporaneamente vennero colorati con eosina gialla e bleu di metilene e confrontati; ma nessuna differenza si notò al microscopio nei corpuscoli rossi e bianchi dei vari conigli e dello stesso coniglio alle varie osservazioni.

Trattati i preparati, prima della colorazione, con H^2O^2, quella avveniva assai più intensa in tutti i sangui, che senza ossidazione; ma senza differenza fra i vari conigli e il sangue dello stesso coniglio preso nei diversi tempi.

Se però il vetrino, con sangue fissato, si esponeva ai vapori di S^2C e poi s'immergeva in H^2O^2, i corpuscoli perdevano leggermente la pro-

prietà di ossidarsi e quindi di colorarsi più intensamente. Ciò però avveniva senza differenza fra il sangue, preso nei vari periodi e fra i vari conigli.

Terminato l'esame del sangue, i conigli vennero uccisi, recidendo loro i vasi del collo.

Il sangue che sgorgava dalla ferita veniva raccolto in una provetta, calcolando il tempo perchè esso divenisse un grumo compatto. Ripetuta l'osservazione su i tre conigli con lo stesso metodo, non ho notato alcuna differenza di tempo per la formazione del coagulo fra i vari sangui; od almeno essa era tanto piccola che non credo darle importanza.

Esami necroscopici. — Degli animali uccisi viene eseguita la necroscopia, che ci dà i seguenti risultati:

Nei conigli tenuti a respirare il S^2C la cute della scatola cranica mostra delle piccole ecchimosi.

Aprendo la scatola cranica dei conigli *A* e *B*, si sprigionano delle piccole bollicine di gas. Le meningi non mostrano differenze apprezzabili fra i vari conigli. Al disotto di esse il liquido è poco, ma non è in quantità molto maggiore nemmeno nell'animale di controllo. Nessuna alterazione o differenza apprezzabile ad occhio nudo all'esame del cervello, del cervelletto e midollo, sia alla superficie che internamente.

All'apertura della cavità toracica ed addominale si sente un leggero odore penetrante simile a quello di S^2C nei conigli *A* e *B*. Dei visceri, il cuore, i grossi vasi, il polmone non mostrano differenza alcuna nei tre conigli: il fegato è leggermente più grosso e più pallido nei conigli da esperimento, che in quello di controllo; la milza nei primi è un po' ingrossata; nulla degno di nota nel rene: lo stomaco è un po' più grosso nei primi, ed esso e gl'intestini lasciano vedere delle piccole macchiette nerastre simili a quelle della cute.

Nelle urine raccolte dalla vescica non si riscontra alcun elemento patologico.

Il cervello e midollo, il cuore, pezzettini di polmone, di fegato, di milza, di rene vengono induriti con Cl^2Hg al 5‰. Pezzi di fegato, cuore e rene vengono trattati con acido osmico. Di tutti questi organi, ad eccezione del cervello e midollo, se ne fa l'esame microscopico, di cui si ebbe il seguente risultato.

Esame microscopico degli organi interni dei conigli da esperimento.

Il cervello e midollo spinale per mancanza di reagenti e per la poca pratica, che io ho sulle loro alterazioni microscopiche, non poterono essere esaminati, benchè facilmente avrebbero dato molto lume sull'argomento.

Polmone. — Tagli colorati con ematossilina ed eosina non lasciarono distinguere differenza alcuna fra i tre conigli, nè a carico dei vasi, nè dell'epitelio respiratorio o del tessuto interstiziale. Non emorragie capillari o depositi anormali.

Cuore. — Tagli della muscolatura del cuore presi verso la base del ventricolo sinistro, con la sopra accennata colorazione, mostrano fibre muscolari striate nucleate e di grossezza uguale nei tre conigli, senza deposito o degenerazione evidente alcuna: i tagli colorati con acido osmico mostrano

delle macchie brune fra le fibre, ma non molto grandi in tutti e tre ed altre piccolissime nell'interno degli elementi del cuore nei conigli, che erano stati esposti a vapori di gas S^2C, non nell'altro; per cui si può dedurre che i conigli *A* e *B* mostrano accenno ad infiltrazione e degenerazione grassa, nulla quello di confronto *a*.

Fegato. — Tagli colorati con eosina ed ematossillina ci mostrano i lobuli epatici uguali per aspetto nei vari conigli. La disposizione raggiata delle cellule, l'aspetto granuloso di esse, la grandezza e situazione dei nuclei, la disposizione e struttura dei canalicoli e dei vasi non sono differenti nei diversi animali. I tagli dei pezzi colorati e fissati con acido osmico ci mostrano invece nei conigli *A* e *B* delle piccole goccioline di adipe nelle cellule epatiche, alcune delle quali mostrano il nucleo spostato dal centro. Le macchie dell'adipe sono più grosse e frequenti verso il centro dei lobuli. Da ciò si può dedurre che i conigli tenuti a respirare emanazioni di S^2C mostrano leggera degenerazione grassa del fegato.

Milza. — Nessuna differenza esiste fra i preparati microscopici di quest'organo nei tre conigli. Le trabecole ed i corpuscoli del Malpighi sembrano in alcuni punti più grandi in quelli da esperimento.

Rene. — Nessuna differenza all'esame microscopico del rene fra i vari animali.

Riepilogando: l'esame microscopico degli organi degli animali da esperimento ci dà solo una certa differenza fra il cuore ed il fegato dei conigli *A* e *B*, tenuti a respirare gas S^2C e il cuore e il fegato di quello di confronto, e consiste essa in una maggiore infiltrazione grassa che si ha nei primi.

Inoltre le osservazioni fatte sugli operai e sugli animali da esperimento han condotto allo stesso risultato e gli effetti deleteri e venefici del S^2C sull'organismo, quando agisca in dosi minime possono considerarsi bene stabiliti, non nascondendo la possibilità che altri, oltre quelli da me osservati, ve ne possano essere, a me sfuggiti per la piccola quantità di cognizioni e di mezzi adoperati nella ricerca.

V. — Conclusioni generali.

Volendo poi dare un'interpretazione alle osservazioni precedenti, noi vediamo che *l'emaciazione*, *il colorito giallo terreo*, *il senso di stanchezza*, a cui gli operai vanno soggetti, sono in istretto rapporto, come anche può dimostrarlo l'osservazione sugli animali, con l'assorbimento lento di S^2C e sono conseguenza dell'anemia prodotta dallo stesso gas.

Le *alterazioni, sia pur lievi, del miocardio* e del *fegato* osservate alla necroscopia dell'uomo e degli animali, sono corrispondenti ai leggeri disturbi funzionali del cuore ed hanno la loro interpretazione, sia nell'anemia (onde insufficienza di nutrizione degli organi), sia nell'assorbimento del gas, che può agire direttamente sugli elementi (Delpek, 22).

I *disturbi funzionali degli organi della digestione*, insieme all'accelerata putrefazione, riscontrata nel cadavere ed alla notevole quantità di gas dell'odore del S^2C, che usciva dalla cavità di esso e degli animali da esperimento alla necroscopia, dimostrano assai chiaramente esservi un assorbimento di gas ed una ritenzione nell'organismo. I disturbi della digestione possono poi dare una difficile assimilazione delle sostanze nutritive, e quindi una denutrizione dei tessuti, spiegandoci così molti dei fatti osservati su quegli operai, cioè l'anemia, il senso di stanchezza, ecc.

Il fatto poi del miglioramento degli operai, dopo un certo tempo di allontanamento dallo stabilimento, è un indice sicuro che la causa prima e sola dei disturbi, osservati all'esame clinico dei dodici operai, e delle diversità riscontrate fra gli animali da esperimento e quelli di controllo, e delle poche alterazioni macroscopiche e microscopiche degli organi alla necroscopia, è il *lento e continuo assorbimento di* S^2C.

Abbiamo poi altra prova anche più luminosa all'esame del sangue. Di fatti l'abbassamento del valore dell'Hmb., del numero delle emazie e del valore globulare dopo un periodo anche non molto lungo di lavoro in quello stabilimento dimostra che le emanazioni continue, sia pur leggere, di S^2C determinano nel sangue un vero stato di *cloroanemia* ed *ipoglobulia.*

Questo stato patologico è prodotto dall'azione venefica sugli organi ematopoietici o da un'azione emodistruttrice? A questa domanda non è facile rispondere.

Le osservazioni da me fatte sugli operai e sugli animali dimostrano che il fatto è complesso, come il Nothnagel ne pensa. Invero l'alcalescenza del sangue è diminuita in quegli operai durante il lavoro e sembra anche negli animali esposti a respirare in un ambiente ricco di emanazioni di gas S^2C, mentre risale con il riposo. Perciò noi dovremo ascrivere il S^2C alla categoria di quei veleni che oltre essere emolitici, come il CO ed alcuni veleni batterici, hanno un'azione rallentatrice almeno, se non modificatrice, del ricambio materiale dei tessuti, che è in diretto rapporto con la reazione del plasma sanguigno.

Volendo poi dare un'interpetrazione alla cifra dataci dai globuli che resistono alla soluzione ipoisotonica di ClNa 0.32, ed al rapporto di questa con la quantità totale delle emazie, bisogna considerare che questi due valori rappresentano, secondo il Viola (23), il contingente nuovo, che alla gran massa del sangue, continuamente in distruzione, viene dagli organi ematopoietici. Ciò egli dimostra con il

fatto che essi aumentano dopo copiosi salassi, nella clorosi semplice, nell'allattamento, ecc. Però è anche dimostrato che tale aumento dipende dall'ingresso nella massa del sangue di emazie troppo giovani e talvolta anche nucleate, che poi dopo una cura ferrica restano più a lungo nell'organo istogenetico e vengono fuori più adatti ad assorbire O^2, come riscontrarono l'Arcangeli (24), il Monari (25), il Piperno (26). Nelle anemie degli individui malarici, cancerigni invece si ha assai basso il numero dei corpuscoli di R^1 ed il Rap. R^1 e ciò ci indica un'azione riparatrice degli organi ematopoietici assai debole per mancata od alterata nutrizione di essi. Quindi il S^2C per questi fatti sarebbe solo emolitico, perchè R^1 e Rap. R^1 sono molto aumentati, e non avrebbe alcuna azione sugli organi ematopoietici e sulla loro nutrizione. Ma anche la vitalità dei globuli [Hamburger (27), Manca (28), Fulloni (29)]; la minore ossigenazione del sangue [Piperno (30), Viola (31), Molon (32)]; l'azione di alcuni veleni, ad esempio della polmonite, dei funghi, aumentano tale resistenza (Piperno, Molon) per un'azione incognita sul paraplasma delle emazie, che si renderebbe meno atto all'assorbimento di acqua e sul reticolo protoplasmatico, che diventerebbe più resistente alla distensione. Per questi fatti l'aumento di R^1 e Rap. R^1 potrebbe avere un'interpetrazione anche qualora al S^2C si volesse dare una azione sull'ossigenazione del corpuscolo e sulla costituzione chimica di esso.

A spiegare ciò gioverebbero molto le cifre della R^2 ed R^3; ma le loro variazioni sono di poca importanza nelle ristrette osservazioni, e solo R^3, più basso del fisiologico, fa rassomigliare l'anemia dei nostri operai all'anemia semplice delle giovanette, in cui si ha una diminuzione della coesione del reticolo protoplasmatico delle emazie e un aumento della densità del paraplasma, a cui si unisce un'attiva azione riparatrice degli organi formatori del sangue, quasi che la natura volesse da sè riparare alla perdita subìta; dalle osservazioni microscopiche poi del sangue, previa esposizione ai vapori di S^2C ad ossigenazione in H^2O^2, e colorazione, noi possiamo dedurre che il S^2C ha un'azione chimica sull'Hmb, combinandosi con essa in un composto assai più stabile dell'OHb.

Questi fatti, in fine, ci possono far sospettare che lo stato d'ipoglobulia e la scarsa quantità di Hmb; le alterate funzioni digestive e forse di ossidazione dei tessuti abbiano determinato in quegli operai una denutrizione vasale e specialmente del sistema capillare, che, come scrive lo Charcot, potrebbe essere causa di emorragia cerebrale. Così si spiegherebbe anche la morte dei due disgraziati operai di quello stabilimento.

Maggior lume potrebbe dare a questo fatto l'esame microscopico accurato del cervello degli animali da esperimento, a me assolutamente impossibile.

VI. — **Corollari pratici.**

Affinchè l'esame dello stabilimento, le osservazioni sugli operai e sugli animali da me eseguite possano essere utili in qualche modo, non sarà fuori di luogo trarre qualche applicazione pratica dalle conclusioni di questo lavoro.

Poichè nello stabilimento per l'estrazione dell'olio di sansa si respirano quantità piccole di S^2C, che arrecano danno all'organismo degli operai, che vi lavorano, sarà equo e necessario provvedere che il lavoro in quell'ambiente riesca il meno possibile deleterio e malsano, con una serie di misure e provvedimenti suggeriti dall'igiene industriale. Bisognerebbe quindi:

1° Che l'industria estrattiva dell'olio di sansa con il S^2C venisse classificata nell'elenco pubblicato dal Ministero dell'Interno in data 28 aprile 1895 fra le industrie insalubri di prima classe.

2°. Che non solo vi fosse impedito il lavoro al di sotto del 15° anno, secondo la tabella *A* del regolamento sul lavoro delle donne e dei fanciulli, ma anche al di sopra di un certo numero di anni; e non vi venissero accettati che individui perfettamente sani.

3° Che una mercede giornaliera adeguata al pericolo ed al danno, a cui l'operaio si espone, venga data ad esso, affinchè, potendosi così meglio nutrire, possa con maggiore facilità resistere all'azione venefica del S^2C. Invero le osservazioni da me praticate hanno portato alla conclusione che maggior danno ricevono quegli operai, che sono troppo giovani o troppo vecchi o che possono poco nutrirsi.

4° Che dopo un periodo di qualche mese, il lavoro venga sospeso ed alternato con un periodo lungo di riposo, in cui sarà bene che gli operai si dedichino a lavori campestri, e che venga stabilito un orario più rispondente alle leggi della fisiologia. Ciò trova la sua ragione nell'osservare che gli operai migliorano molto nelle condizioni fisiche generali e nella cachessia, dopo sole poche settimane di riposo, e specialmente, se gli operai sono giovani e da poco lavorano nello stabilimento.

5° Che il macchinario dell'industria venga spesso riparato e modificato con le innovazioni suggerite dalla ingegneria industriale, per impedire che emanazioni gassose vengano aspirate dagli operai;

e che per qualche ora venga sospeso il lavoro, se sono avvenute accidentali fughe di S^2C.

6° Che sia accuratamente curata l'areazione dello stabilimento, specialmente in basso, dove il S^2C più pesante dell'aria si può raccogliere, e vengano forniti di speciali maschere gli operai, almeno quando compiono lavori, che li mettono nella possibilità di aspirare aria ricca di gas S^2C.

7° Che nè le macchine, nè gli operai vengano forzati a compiere il lavoro in un tempo minore del necessario alle varie operazioni di estrazione; e che specialmente sia sempre uguale e lungo il periodo di lavatura della sansa con vapore acqueo ed il successivo raffreddamento, affinchè le ultime traccie di S^2C siano completamente trasportate fuori dei cilindri e lo svuotamento di questi non dia luogo ad emanazioni gassose: che tutti i recipienti e liquidi, che possano contenere S^2C, non siano in comunicazione con l'aria dello stabilimento.

8° Che una persona tecnica responsabile diriga il lavoro ora affidato a semplici braccianti, appena pratici, punto edotti dei danni, che possono ricevere dall'assorbimento di S^2C e che tutti gli addetti a questo lavoro siano prima dell'ammissione bene ammaestrati dal direttore sui pericoli e sui danni dell'assorbimento anche minimo di S^2C..

Tali modificazioni ed istruzioni non saranno molto gravose agli industriali, che potrebbero con un personale dirigente più esperto ricavare maggiori guadagni dall'industria, che già rende più del 20 % (!) sul capitale applicatovi.

Campello sul Clitunno, settembre 1906.

BIBLIOGRAFIA.

1. G. Y. Giglioli. *Le malattie del lavoro.* Roma, 1902.
2. Iaks. *Collezione del Nothnagel.* Volume 1°.
3. Delpek. *Memoires sur les acides.* Paris, 1884.
4. Lehmann. *Esperimentelle Studien*, ecc. Arch. f. Hygiene.
5. Kobert. *Lehrbuch der Intoxicationen.* Stuttgard, 1893.
6. Zeitschrift für Gewerbe-Hygieno. Agosto 1900.
7. Oliver. *Diseases of occupations.*
8. Iaks. Opera citata.
9. Delpek. Les Annales d'Hyg. publ.; 1863.
10. Landenheimer. *Die Schuefelkohlenstoff Vergiftung der Gummiarbeiter.* Berlin, 1900.

11. HERMANN. *Ueber Vergiftungen*, ecc. Berlin, 1890.
12. LANDOIS. *Fisiologia dell'uomo*, ecc. Vol. 1°.
13. CENCI. *Resistenza dei corpuscoli rossi*, ecc. Riforma medica, 1900.
14. MOSSO. *La resistenza dei corpuscoli rossi.* R. Accademia dei Lincei, serie IV, vol. 3°.
15. VIOLA. *Il metodo per la misurazione delle resistenze colle soluz. clorid.* Policlinico, sez. med., 1902.
16. HAMBURGER. *Die isotonischen Koeffizienten und die rothen*, ecc. Archiv der phisiologie von Du-Bois Rennoud, 1886.
17. PIPERNO. *Contributo allo studio della resistenza dei corpuscoli rossi*, ecc. Policlinico, volume XI, 1900.
18. VIOLA. Lav. cit.
19. PIPERNO. Lav. cit.
20. BLASI. *Effetti dell'acqua ossigenata sulla coloraz. degli erit.*, ecc. Roma, 1900.
21. CRAUS. *Fisiologia del Landois.*
22. DELPEK. Op. cit.
23. VIOLA. Op. cit.
24. ARCANGELI. *La Clorosi.* Roma, Soc. Dante A.
25. MONARI. *La Clorosi.* Atti della R. Acc. di scienze. Modena, 1900.
26. PIPERNO. Op. cit.
27. HAMBURGER. *Osmotischer Druck und Jonenlehere.* Wiesbaden, 1902.
28. MANCA. Lo Sperimentale, 1895, fasc. V e VI.
29. FULLONI. *Sulla resistenza del sangue.* Morgagni, 1897.
30. PIPERNO. Op. cit.
31. VIOLA. *Le resistenze dei globuli rossi alle soluz. clorosodiche*, ecc. Morgagni, anno XLV.
32. MOLON. *Ricerche fisico-chimiche sul sangue.* Padova, 1903.

Istituto antirabico annesso all'Istituto d'igiene
della R. Università di Sassari

Contributi sperimentali alle studio della rabbia

Note riassuntive (1)

per il prof. CLAUDIO FERMI.

I.

La recettività dei muridi verso l'infezione ipodermica di virus rabbico.

I comuni animali d'esperimento che hanno sin qui servito nello studio della rabbia (coniglio, cavia, cane e gatto), sono, come si sa e come vedremo, pochissimo recettivi alle iniezioni di virus rabico per via ipodermica. Ora, in tutte le ricerche riguardanti l'immunizzazione o la cura della rabbia, lo studio dei vari agenti chimici sul virus rabico nella ricerca del medesimo in liquidi molto diluiti, in filtrati e quando si dubita della presenza del virus, nonchè nelle esperienze a scopo diagnostico con materiale in incipiente putrefazione, sarebbe stato utilissimo un animale di esperimento recettivo al virus rabico per via ipodermica.

Animali recettivi per via sottocutanea verso il virus fisso dell' Istituto antirabico di Sassari e verso il virus di strada di qualunque origine, io li ho trovati sin dal 1900 (2), nelle comuni specie di muridi

(1) I lavori completi sono stati pubblicati nel Giornale della R. Soc. It. d'Igiene, anno 1906 e dalla tipografia edit. degli Olmi. Scansano, 1906.

(2) Le mie prime esperienze di trasmissione della rabbia nei muridi per via subdurale risalgono al 1898 e quelle per via sottocutanea al 1899: Vedasi la tesi del laureando Guzzardi condotta a termine nell'Istituto d'igiene della R. Università di Roma, 1898, ed i miei due lavori completi pubblicati nel Giornale della R. Soc. ital. d'Igiene, intitolati, l'uno: « La ricettività dei muridi verso l'infezione ipodermica di rabbia » e l'altro: « Il comportamento del virus rabico e di alcuni microrganismi verso i filtri di carta svedese a vari strati ».

quali il *mus rattus*, il *mus decumanus*, il *mus musculus* ed il ratto ed il topolino albino, varietà dei due ultimi.

Prima e dopo la mia nota del 1905 pubblicata nella *Rivista Medica*, n. 36, scarsissimi o nulli furono i tentativi di infezione per via sottocutanea nei muridi istituiti da altri.

Le esperienze di Remlinger (1), di Carlos França (2), di Nicolle e Chaltiel (3) e di Galli Valerio (4), riguardano quasi esclusivamente l'infezione subdurale, corneale ed intramuscolare.

La pubblicazione poi del Galli Valerio, come l'ultima di Carlos França (5) in proposito sono posteriori alla mia prima nota preventiva pubblicata nella *Riforma Medica*, anno XXI, n. 36 (6).

Ora, con questi animali ho potuto studiare l'azione di una numerosa serie di sostanze chimiche sul virus rabico; ho potuto studiare la virulenza del liquido cefalo rachidiano, della saliva, dell'urina, del midollo delle ossa, del pancreas, delle capsule surrenali, ecc., secreti, escreti ed organi questi che, o per la loro tossicità, o per il loro contenuto in microrganismi, non sarebbero stati affatto tollerati sotto dura in forte quantità, come era necessario iniettare per ottenere risultati decisivi.

I suddetti animali recettivi al virus rabico per via ipodermica mi hanno anche servito in esperienze d'immunizzazione contro la rabbia molto più efficacemente di quello che non avrebbero potuto fare animali sensibili prevalentemente per via subdurale, sia perchè è molto più facile immunizzare contro infezioni avvenute per via cutanea che non quando il virus è inoculato direttamente nei centri nervosi. Non dimentichiamo poi che lo scopo pratico di simili tentativi d'immunizzazione è sempre quello di salvare l'animale e l'uomo da infezioni avvenute per via sottocutanea.

I ratti specialmente sopportano sino 2-3 cmc. al giorno di emulsione di sostanza nervosa o di altri organi.

Dalle varie centinaia di ratti e topolini che da oltre 6 anni si stanno inoculando nell'Istituto antirabico di Sassari e di cui una

---

(1) Remlinger. Soc. de Biol., 1904, gennaio 9.

(2) Carlos França. Revista de med. veterinaria, n. 40, 1905.

(3) Nicolle et Chaltiel. Annales de l'Institut Pasteur, p. 644. 1904.

(4) Galli Valerio. Centralblatt für Bact. XL, 1905, fasc. 2, 1905, fasc. 3, 1906.

(5) Carlos França. Arch. d. l'I. Royal de Bact. de Camara Pestana, vol. I, fasc. 1. Lisbona, 1906.

(6) Al prof. Galli Valerio sfuggì, come egli mi scrisse, la mia prima pubblicazione e probabilmente non fece a tempo a citarla nella sua seconda memoria, ciò che egli avrebbe certamente fatto, avendogli io scritto ed inviata la mia pubblicazione avanti che uscisse la seconda parte del suo lavoro. Lo stesso accadde a Carlos França ed al Mazzei.

parte han servito alle presenti ricerche, ho potuto concludere, come si vedrà in appresso, che questi animali, ed in modo speciale i ratti e topolini neri, inoculati per via sottocutanea col virus fisso di Sassari, possono gareggiare in recettività verso la rabbia coi comuni animali d'esperimento inoculati sotto dura.

In detto Istituto perciò, tanto a scopo diagnostico che nelle esperienze, si usano su larga scala i muridi.

Altri vantaggi di questi animali sono la piccola mole, per cui possono conservarsi in piccole gabbie o in vasi occupando poco spazio, il minor costo e la minore spesa di mantenimento.

L'immobilizzazione dei muridi io l'ottengo mediante la narcosi con l'etere. Ecco come procedo da oltre 15 anni:

Se si tratta di inoculare sotto cute dei topolini albini o grigi o dei ratti albini io li afferro con una pinza e li pongo in un bicchiere contenente un po' di ovatta impregnata di etere.

Se si tratta invece di ratti neri io li addormento introducendo il batuffolo di ovatta impregnato di etere racchiuso in una reticella metallica ed affidato ad un spago, nello stesso vaso nel quale si trova il ratto.

Appena addormentato l'animale, lo inoculo e lo ripongo nello stesso vaso dal quale intanto si è scacciato l'etere soffiandovi dentro fortemente per 4-5 volte.

Seguendo questo procedimento si può iniettare quotidianamente per varie settimane un forte numero di animali senza inconvenienti e senza le perdite lamentate da taluno.

Io conservo poi i muridi in esperimento in comuni vasi nei quali il tappo smerigliato è sostituito da un coperchio metallico fissato a cerniera e bucherellato. Il vaso viene poi riempito in mancanza di torba, sino ad un terzo con uno strato di carbone.

Gli animali tenuti in tal modo non mandano puzzo di sorta. Così mentre p. e. senza carbone in una stanza non si può tollerare la presenza di alcuni topolini (questi mandano, come si sa, un odore molto più sgradevole dei ratti), col carbone invece se ne possono sopportare stabilmente anche 40-50.

Se è regola l'isolare l'uno dall'altro gli animali inoculati di rabbia, è poi necessità quando si tratta del *mus rattus* e del *mus decumanus*, perchè molto frequentemente l'uno divora l'altro.

Ciò non avviene che raramente pei ratti bianchi e quasi mai per topolini, sia albini che grigi purchè, naturalmente, non siano spinti dalla fame. Per la stessa ragione non si mescoleranno mai ratti, sia pure albini, con topolini.

È indispensabile conservare i topolini ad una temperatura superiore ai 12°, perchè sono molto sensibili verso il freddo.

Inoltre è sempre consigliabile, specialmente d'inverno, quando qualcuno dei topolini infettati si presenta accasciato e quasi moribondo, di porlo sollecitamente alla temperatura di 25°-30°: Se si tratterà di raffreddamento non sarà difficile vederlo ritornare vivace come prima in breve tempo.

Da una parte l'importanza indiscutibile di aver trovato la possibilità di infettare di rabbia certamente e costantemente degli animali per via sottocutanea e dall'altra parte l'incredulità che questo fatto avrebbe potuto incontrare, mi spinsero a riunire in diverse tabèlle una buona parte delle esperienze relative ai vari muridi (oltre 500) da me infettati e morti di rabbia.

La compilazione di dette tabelle mi fu anche indispensabile per poter studiare il periodo d'incubazione e la durata della malattia nei muridi infettati per varie vie.

Dalle sopradette tabelle, che qui tralascio per brevità, risulta quanto segue:

1° Quasi tutti i muridi, cioè 564, e precisamente 220 ratti bianchi, 141 ratti neri, 169 topolini bianchi e 34 topolini neri, inoculati 527 sotto cute (402 con virus fisso e 125 con virus di strada) e 37 sotto dura (14 con virus fisso e 23 con virus di strada) sono morti di rabbia.

2° L'epoca della morte, calcolata soltanto sugli animali inoculati di virus fisso di Sassari e non sottoposti ad alcun trattamento speciale (immunizzazione od attenuamento del virus) fu, per le varie specie di muridi, la seguente:

a) dei ratti bianchi inoculati sotto cute di virus fisso, il 49 % morì dopo 7 giorni, il 10 % dopo 12 giorni, l'8 % dopo 15 giorni, il 6 % dopo 9 giorni ed il 12 % dopo 6 giorni;

b) dei ratti neri inoculati di virus fisso sotto cute, l'80 % morì dopo 7 giorni, l'11.4 % dopo 9 giorni ed il 7 % morì dopo 5 giorni;

c) dei topolini bianchi, inoculati di virus fisso sotto cute il 55 % morì dopo 7 giorni, il 25 per % dopo 9 giorni ed il 20 % dopo 5 giorni;

d) Dei topolini neri inoculati di virus fisso sotto cute il 77 % morì dopo 7 giorni e il 22 % dopo 6 giorni;

e) dei ratti bianchi, iniettati di virus fisso sotto dura, il 93 % morì dopo 7 giorni ed il 6.2 % dopo 5 giorni;

f) dei ratti bianchi, inoculati di virus di strada sotto cute, il

55 % morì dopo 13 giorni, il 4 % dopo 16 giorni, il 20 % dopo 14 giorni e l'11 % dopo 12 giorni;

g) dei ratti neri, iniettati sotto cute di virus di strada, il 31 % morì dopo 13 giorni, il 20 % dopo 16 giorni, il 17 % dopo 15 giorni, l'11 % dopo 12 giorni, l'8.5 % dopo 20 giorni, il 2.8 % dopo 17-21-22 giorni.

Conclusione. — *a*) L'epoca della morte degli animali inoculati sottocute di virus fisso di Sassari cambiò alquanto per le varie specie di muridi esperimentate. Difatti mentre dei ratti neri in sette giorni ne morì l'80 %, dei ratti bianchi, invece ne soccombettero solo il 61 %, essendo il rimanente morto in 9-15 giorni.

b) Confrontando la sensibilità dei topolini bianchi con quella dei ratti bianchi si ha che i topolini sono più sensibili dei ratti, perchè la percentuale dei topolini (80 %) che morirono in sette giorni fu di molto superiore a quella dei ratti (49 %).

c) I muridi ed in special modo i ratti neri (*mus decumanus*, *mus rattus*) ed i topolini neri (*mus musculus*) inoculati sotto cute col virus fisso di Sassari hanno raggiunto una mortalità uguale a quella che dànno le varie specie di animali inoculati sotto dura.

Il Galli Valerio iniettò sottocute di virus rabico soltanto, 2 muridi; iniettò invece 9 muridi per via intramuscolare e precisamente 2 ratti bianchi, 3 ratti neri e 4 topolini neri. Tutti gli altri vennero inoculati per via subdurale o corneale.

Dei 9 animali inoculati nei muscoli 3 soli si salvarono e precisamente il ratto bianco n. 22 ed i topolini neri n. 72-75. Da questi 3, per altro, bisogna toglierne uno e precisamente il ratto bianco n. 22 completamente refrattario alla rabbia, come ebbero a dimostrare ripetute inoculazioni subdurali (1).

---

(1) *Frisch ottenne, nei conigli inoculati di virus fisso sotto dura, l'1.5 % di casi negativi (14 : 200) ed Högyes il 60 % nei cani (6 : 10).*

Per inoculazione di virus di strada lo stesso Högyes ottenne risultato negativo nel 40 % di cani (6 : 15).

È difficile, ma non impossibile, trovare, tra le specie di animali recettivi alla rabbia, degli individui naturalmente refrattari a ripetute iniezioni subdurali.

Fra parecchie centinaia di muridi da me inoculati di virus rabico non ho trovato che qualche ratto e qualche topolino bianco completamente refrattario alla rabbia.

Altri autori trovarono pure qualche caso di refrattarietà anche nei cani come segue:

1° Hertwig iniettò inutilmente per tre anni un cane per tutte le vie, Altri cani superarono l'infezione per 3-4 volte, poi soccombettero.

2° A Frisch su 900 conigli inoculati sotto dura ne sopravissero 14, cioè l'1.5 %.

3° Un cane inoculato da Högyes sotto cute con un pezzetto di midollo contrae la rabbia e poi guarisce. S'infetta allora altre 11 volte sotto cute, si

Si avrebbe avuta quindi una mortalità di 6 : 8 cioè del 77 %.

Qualunque possa essere il valore di questa percentuale, essa conferma la sensibilità da me dimostrata, per la prima volta, dei muridi all'infezione sottocutanea di rabbia (1).

Il quadro sintomatologico dei muridi affetti da rabbia sperimentale sia per iniezione sottocutanea che subdurale, si avvicina molto a quello che presentano i conigli e le cavie.

Detti sintomi sono i seguenti:

Uno o due giorni prima della morte l'animale presenta paresi e poi spiccata paralisi del treno posteriore e qualche volta dell'anteriore, secondo il punto di inoculazione, si trascina cogli arti anteriori o fa qualche salto in avanti. Se cade non riesce spesso a rialzarsi e talora rotola su sè stesso. Quando sta fermo ripiega sovente il corpo alquanto ad arco, così che la testa viene a portarsi verso l'addome.

Il respiro si fa affannoso, talora apre e chiude la bocca per qualche tempo.

L'occhio rimane vivace nei ratti, contrariamente a quello che avviene nella maggioranza delle altre malattie infettive e presenta invece spesso una congiuntivite acuta siero purulenta nei topolini.

Raramente mi fu dato di osservare indubbia tendenza a mordere non solo negli animali infettati con virus fisso, ma anche con quelli infettati di virus di strada (2).

Quasi sempre al secondo giorno, meno frequentemente nello stesso giorno e più raramente ancora al terzo giorno da che è incominciata la paralisi, l'animale soccombe.

---

fa mordere da cani arrabbiati, si inocula parecchie altre volte sotto dura, ma sempre inutilmente.

4° Un altro cane iniettato pure da Högyes con un cmc. di emulsione di virus fisso sotto la cute della nuca, presentò, dopo 17-21 giorni sintomi passeggeri di rabbia furiosa. Inoculato, dopo 60 giorni, con virus fisso sotto dura presentò, dopo 25 giorni, di nuovo sintomi passeggeri (per 3 giorni) di rabbia furiosa, dopo di che guarì completamente. Dopo 35 giorni inoculato di nuovo con virus di passaggio sotto dura, sopravvisse pure.

(1) Maggior conferma ancora venne data, come vedremo, nella mia nota sulla variabilità della virulenza del virus fisso, dal prof. De Blasi, direttore dell'Istituto antirabbico di Palermo e dal dott. Mazzei dell'Istituto batteriologico municipale di Messina, i quali ottennero pure una mortalità di circa il 100 % nei muridi inoculati di virus fisso sotto cute.

(2) De Blasi e Russo Travali (Baumgarten-Jahresb., 1890, p. 52), descrissero un caso di morsicatura in un uomo e Kraïouchkine (Baumgarten-Jahresb., 1893, p. 116) e Remlinger (Comptes-rendus Soc. Biol., vol. LIX, 1° luglio 1905, p. 72) un altro caso di morsicatura in un coniglio per opera di due sorci idrofobi. Remlinger e Carlos França osservarono pure piuttosto raramente la vera rabbia furiosa nei muridi, non così il Galli Valerio sperimentando con un virus di strada rinforzato attraverso i muridi stessi.

Un singolare e prolungato stato d'eccitamento l'ho osservato in alcuni topolini neri inoculati col virus fisso pervenutomi dall'Istituto antirabico di Firenze, ed in un ratto nero infettato di virus di strada, sotto cute. Quest'ultimo, in preda a rabbia furiosa, morsicò vari topolini posti espressamente nella sua gabbia senza per altro trasmettere ai medesimi l'infezione.

Siccome non ho trovato differenze apprezzabili nella recettività tra il *mus rattus* ed il *mus decumanus* verso la rabbia e siccome nella stessa esperienza entrano spesso contemporaneamente le due specie di ratti, così per comodità e semplicità li ho riuniti entrambi sotto la denominazione di ratti neri.

Alquanto variabile è la durata della malattia, cioè del tempo che passa dall'inizio della paralisi alla morte dei muridi infettatati sotto cute di virus fisso.

Ecco che cosa ho potuto concludere in proposito:

1° Nei ratti bianchi la durata della malattia fu di 2 giorni nel 60 % circa e del 40 % di 1 giorno. In qualche raro caso la malattia durò anche 3 giorni, mentre in qualche altro durò poche ore soltanto.

2° Nei ratti neri invece che sono, come si disse, alquanto più sensibili dei bianchi, si ebbe la morte dopo 1 giorno nell'85 % e nel 15 % circa dopo 2 giorni. In qualche rarissimo caso si ebbe anche qui la morte dopo 3 giorni e meno raramente dopo poche ore.

Differenza nella durata del periodo d'incubazione e nella durata della malattia tra i muridi inoculati sotto cute e quelli inoculati sotto dura.

Confrontando la durata della malattia con la durata del periodo d'incubazione tra i muridi inoculati sotto cute e quelli inoculati sotto dura, non trovai nessuna differenza nè visibile, nè costante.

La recettività dei muridi infettati sotto cute confrontata a quella dei muridi infettati sotto dura.

I risultati non variano molto se invece di inoculare i muridi sotto cute, si inoculano sotto dura.

Infatti da una tabella, nella quale figurano le percentuali della mortalità da me ottenute inoculando i muridi sotto cute è risultato quanto segue:

1° I muridi inoculati sotto cute col virus fisso dell'Istituto antirabbico di Sassari diedero, presso a poco, la stessa mortalità (100 %) dei muridi inoculati sotto dura dal Galli Valerio col virus fisso di Torino.

2° Riguardo all'epoca della morte, mentre dei ratti bianchi e

neri inoculati di virus fisso sotto dura ne morì, avanti il 7° giorno, il 16.6 % dei bianchi e l'8.8 % dei neri, non ne morì invece nessuno di quelli inoculati sottocute, sibbene il 20 % dei topolini neri.

3° La percentuale dei ratti bianchi inoculati sotto dura che morirono al 7° giorno fu circa il doppio (59 %) di quelli inoculati sottocute (32 %).

La percentuale dei ratti neri inoculati sotto dura e morti al 7° giorno superò di quattro volte (100 %) quella dei ratti inoculati sotto cute.

4° La percentuale dei ratti bianchi inoculati sotto dura e che morirono in ritardo, cioè oltre il 7° giorno (8°-12°), fu di poco superiore (50 %) a quella dei ratti bianchi inoculati sotto cute (40 %).

La percentuale dei ratti neri che morirono in ritardo fu del 7 % in quelli inoculati sotto dura, e 0 % in quelli inoculati sotto cute.

Concludendo quindi, tutto sommato e calcolato, i muridi iniettati sotto cute non muoiono più tardi di quelli iniettati sotto dura, ma presso a poco nello stesso numero di giorni.

Da un'altra tabella dalla quale figurano le percentuali della durata minima, massima e media della malattia dei vari animali recettivi alla rabbia, risulta quanto segue:

1° Di tutti gli animali sperimentati, compreso l'uomo, i muridi sono quelli in cui la durata della malattia è più breve (minima poche ore, massima 3-4 giorni, media 1-2 giorni).

2° Il massimo della durata si avrebbe, in genere, negli uccelli (minimo 2-5 giorni, massima da 25 giorni a 6-7 mesi).

3° Tra i mammiferi l'istrice ed il riccio sarebbero quelli che avrebbero presentato una più lunga durata della malattia (15 giorni).

4° Tra gli uccelli poi la più breve durata sarebbe data dal *buteo-vulgaris* (4 giorni) e la maggiore dall'anitra (17 giorni) e qualche volta anche dal piccione (10 giorni).

5° Quantunque i muridi presentino la minor durata della malattia non se ne può per nulla concludere che quella stia in relazione colla piccola mole dell'animale. Infatti la durata della malattia è press' a poco la stessa tanto nel coniglio e nel cane che nel cavallo e nel bue.

Di molto maggiore poi che nel cavallo e nel bue si avrebbe nell'istrice, nel riccio e in alcuni uccelli; quindi la durata della malattia, molto probabilmente, più che con la mole, starà in relazione colla resistenza che il sistema nervoso dei vari animali oppone

allo sviluppo ed alla diffusione del virus e della sua azione patogena non che coi mezzi di difesa di tutto l'organismo (1).

E' possibile trasmettere la rabbia infettando i muridi con virus fisso su ferite praticate nella cute?

Per decidere questa quistione istituii diverse ricerche dalle quali risultò che i muridi contraggono la rabbia anche in seguito all'inoculazione di virus fisso (dell'istituto antirabico di Sassari) su ferite cutanee.

II.

Tentativi di trasmissione della rabbia in uccelli non compresi tra le specie dimostrate recettive alla rabbia.

Una volta che disponevo di un virus fisso dotato di una virulenza particolare, mi parve non senza interesse il provarlo anche sopra gli uccelli.

Delle numerose esperienze istituite in proposito riporterò soltanto i risultati, come segue:

Di 49 uccelli (19 verdoni, 15 passeri, 6 cardellini, 5 fringuelli, 1 merlo, 1 corvo ed una poiana) inoculati sotto dura e sotto cute di virus fisso dell'Istituto antirabbico di Sassari, 44 sopravvisero e 5 morirono, ma non di rabbia.

III.

Possono i muridi contrarre la rabbia ingerendo del materiale rabido?

Secondo Galtier, spalmando la bocca con materiale rabido, si avrebbe la rabbia nella proporzione di 4 : 30.

Risultati negativi ottennero invece Delefond, Renault, Lafosse, Reynal, Bourrel ed anche Decroix esperimentando su sè stesso.

Nocard non trasmise la rabbia in una volpe alla quale fece ingerire il cervello e il midollo spinale di volpi e cani idrofobi.

Celli e De Blasi diedero a mangiare quotidianamente per un tempo abbastanza lungo a piccoli conigli ed a cavie, una discreta

---

(1) Anche la lunghezza del periodo d'incubazione non sta in relazione con la mole dell'animale, imperocchè è presso a poco uguale tanto nel topo che nel coniglio e nel cavallo. Così supponendo che il corpo del topolino sia 25 volte più corto di quello del cavallo, in questo il virus (ammesso che si propaghi solo per la via nervosa) percorrerebbe nello stesso tempo un tragitto 25 volte più lungo che nel topo.

quantità di midollo fresco di coniglio rabido senza che gli animali presentassero mai alcun sintomo sospetto di rabbia.

Di Mattei nutrì 2 cani con cervelli ed organi rabici per più mesi senza che gli animali contraessero la rabbia. Portando diverse lesioni (ferite e traumi) nello stomaco e negli intestini, o producendo catarri artificiali con sostanze chimiche e nutrendo gli animali come sopra, questi resistessero all'infezione.

La bile, il succo enterico, il succo pancreatico si mostrarono senza alcuna azione sul virus fisso. Anche il succo gastrico nelle condizioni dell'esperimento non si mostrò molto attivo.

L'importanza dell'argomento sotto vari punti di vista ed i risultati contradittori ottenuti dai vari AA. mi spinsero a riprendere lo studio di questa questione sopra i nuovi animali di esperimento.

Premetto che io intendo soltanto di decidere se i muridi venendo a contatto con materiale rabido e precisamente con carogne di animali idrofobi, nel divorarli possano contrarre la rabbia, e non già se è possibile la trasmissione della rabbia attraverso la mucosa sana del tubo gastro-enterico, nel qual caso bisognerebbe, con tutte le cautele possibili, introdurre il materiale rabido direttamente nelle varie parti del tubo gastro-enterico, evitando il contatto con qualunque altra parte del corpo. Ora mi sembra che gli AA., i quali si sono occupati espressamente della trasmissione della rabbia attraverso le vie digestive, abbiano dimenticato completamente di assicurarsi se gli animali si siano infettati esclusivamente per questa via e che l'infezione non possa essere assolutamente avvenuta per inoculazione della congiuntiva, della mucosa nasale, della cute ed anche della mucosa orale stessa nel rosicchiare ossa appuntite.

Siccome poteva avvenire che gli animali nutriti con materiale rabido stando uniti si comunicassero la rabbia per mezzo di morsi, graffiature, ecc., così istituii le esperienze non solo su animali rinchiusi nella stessa gabbia, ma anche su animali separati in singole gabbie.

Dalla numerosa serie di esperienze istituite, ottenni quanto segue:

1° A differenza di quello che accade pei conigli, cani, gatti, volpi, i ratti ed i topolini possono contrarre la rabbia per l'ingestione di materiale rabido.

2° Dei ratti bianchi nutriti insieme con materiale rabido ne morirono il 78 %, dei topolini bianchi e neri ne morirono il 42 %.

Chi credesse di dover rilevare questa maggiore mortalità nei ratti che nei topolini potrebbe forse spiegare il fatto colla maggior mordacità dei ratti rispetto ai topolini.

3° Dei ratti e topolini isolati, nutriti con materiale rabido, ne morirono il 60 %.

4° Riunendo poi la percentuale degli animali morti sia riuniti che separati si ha una mortalità complessiva del 60 %.

5° I muridi, i quali sopravvivono all'ingestione di materiale rabido per un dato tempo, possono, come vedremo, rimanere immunizzati contro una susseguente infezione sottocutanea di virus di strada non solo, ma anche al virus fisso.

6° Molti dei risultati negativi ottenuti nei tentativi di trasmissione della rabbia mediante la prolungata ingestione di materiale rabico sono forse da spiegare colla immunizzazione dell'animale avvenuta contemporaneamente per questa via.

IV.

Comportamento del virus fisso di vari Istituti antirabici italiani inoculato nei muridi per via ipodermica.

Come per tutti gli agenti infettivi anche per quello della rabbia varia la virulenza.

Queste variazioni non si osservano solo pel virus di strada (1) ma anche pel virus fisso. Pasteur calcolò a 82 % la mortalità nell'uomo per rabbia in seguito a morso di lupi, ed a 6 % per morso di cani.

La virulenza del virus fisso non è identica per i vari Istituti antirabici e varia anche alquanto quella del virus fisso nell'istesso Istituto. Se si inocula una serie di conigli col virus fisso di vari Istituti antirabici si osserva che il virus di qualcuno di questi Istituti può produrre la paralisi già al 4° giorno ed uccidere al 5°-6° giorno, mentre quello di altri può produrre la paralisi al 6° ed uccidere al 7°-8° giorno.

Il Frisch, p. es., avrebbe ottenuto qualche volta la morte di conigli anche al 4° giorno e persino un caso al 3° (!) e pare che si trattasse di rabbia, perchè altri conigli inoculati da questo per controllo morirono paralizzati.

Che la virulenza del virus rabido sia oltremodo variabile lo si rileva inoltre dalle percentuali diversissime ottenute dai vari AA.

---

(1) Pasteur colcolò all'82 % la mortalità nell'uomo per rabbia in seguito a morso di lupi, Bollinger al 40 %, Faber al 36 %, Tralliet al 53 %, Mesnil al 60 %, Renault al 65 % e Vallet al 68 %.

nella mortalità degli animali infettati sia per via subdurale che intraoculare o sottocutanea.

Esaminando i lavori di vari autori, esperienza per esperienza e calcolando la percentale media della mortalità dei vari animali per i vari virus inoculati per le diverse vie ho potuto concludere quanto segue:

La mortalità per infezione subdurale di virus di strada nei cani, mentre fu, secondo Pasteur, del 100 % (5 : 5), fu invece, secondo Högyes, solo del 60 % (9 : 15).

Riguardo all'infezione per la stessa via con virus fisso e virus di passaggio non ho potuto ricavare che le percentuali dalle esperienze dell'Högyes e cioè per virus fisso una mortalità dei cani del 40 % (4 : 10) e per virus di passaggio dell'83 % (5 : 6).

Riguardo all'infezione sottocutanea per virus fisso, mentre Högyes ottenne una mortalità dell'8 %, Kraïouschkine avrebbe ottenuto una mortalità del 31 % (10 : 32).

Riguardo al virus di strada, sempre per infezione sottocutanea, mentre Hertwig ottenne nei cani una mortalità del 16 % (14 : 86), Kraïouschkine l'ebbe nell'87 %.

Mentre per la stessa via e sempre col virus di strada, il Frisch calcolò una mortalità nei conigli del 59.4 %, il Kraïouschkine raggiunse il 20 % (27 : 30), ed in un'altra esperienza l'83 % (5 : 6).

Per ciò che riguarda l'infezione per morso di cani idrofobi (virus di strada) mentre l'Hertwig ebbe nei cani il 20 % (5 : 25) dei casi positivi, il Pasteur ottenne il 40 % (4 : 9).

Riguardo all'infezione endovenosa mediante virus di strada mentre Pasteur avrebbe ottenuto nei cani una mortalità del 62 % (5 : 8), Hertwig non avrebbe raggiunto che una mortalità del 18 % (2 : 11).

Osservando ora la gran differenza nei risultati ottenuti dai vari autori, credetti importante il saggiare la recettività dei muridi verso il virus fisso di varia provenienza studiando contemporaneamente la virulenza del virus fisso di diversi Istituti antirabici italiani.

Il piano di ricerca fu il seguente:

1° Virulenza del virus fisso di varia provenienza inoculato sotto cute ai muridi nella concentrazione ordinaria.

2° Virulenza del virus fisso di varia provenienza inoculato sotto cute ai muridi in varia diluizione allo scopo di stabilire la dose minima mortale di ciascun virus.

3° Virulenza del virus fisso di varia provenienza inoculato sotto dura ai conigli ed alle cavie in varia diluizione.

Per ora riferirò soltanto i risultati ottenuti dalla prima serie di

esperienze istituite, cioè col virus fisso di vari Istituti inoculato nei muridi in concentrazione ordinaria (1).

Per accertarmi della virulenza di ogni virus, assaggiai il medesimo contemporaneamente anche sui conigli.

Tutti i muridi poi che resistettero al virus fisso degli altri Istituti vennero inoculati per confronto col virus fisso dell'Istituto antira bico di Sassari.

Ecco la conclusione che si può trarre dalle varie esperienze:

1° La virulenza del virus fisso iniettato per via sottocutanea varia moltissimo secondo l'Istituto dal quale proviene.

2° Volendo classificare il virus fisso dei vari Istituti secondo la maggior virulenza, si ha sino ad ulteriori ricerche l'ordine seguente:

a) Virus fisso dell'Istituto antirabico di Sassari, che diede una mortalità del 100 %. Questa percentuale fu calcolata su parecchie centinaia di muridi.

b) Virus fisso dell'Istituto antirabico di Palermo, che diede pure una mortalità del 100 % circa. Questa percentuale fu calcolata peraltro su 10 muridi soltanto (2).

c) Virus fisso dell'Istituto antirabico di Roma e di Torino, che diedero entrambi una mortalità del 66 %; Queste percentuali vennero calcolate pel virus fisso di Roma su 9 animali e per quello di Torino su 12.

d) Virus fisso dell'Istituto antirabico di Firenze, che diede una mortalita del 36 %. Questa percentuale venne calcolata su 14 animali.

---

(1) Riporto queste percentuali tanto per dare un'idea grossolana delle differenze nella virulenza del virus fisso di vari Istituti. Si comprende che perchè le percentuali possano essere esatte, bisogna sperimentare su un forte numero di animali non solo della stessa specie, ma anche della stessa età, perchè in ordine di recettività vengono prima i topolini neri giovani, poi i topolini neri adulti, poi i topolini bianchi giovani, poi i ratti neri, quindi i topolini bianchi adulti ed infine, come i meno recettivi vengono i ratti albini.

(2) Anche il virus fisso del Laboratorio batteriologico municipale di Messina, darebbe, come risulta dalle esperienze del dott. Mazzei (non ancora pubblicate), nei muridi inoculati sottocute una mortalità del 100 % circa.

Il virus fisso, dunque, degli Istituti antirabici del Continente, coltivato negli Istituti delle isole avrebbe aumentato la sua virulenza inoculato nei muridi sottocute. Infatti il virus degli Istituti di Sassari, Palermo e Messina, mentre dà una mortalità nei muridi del 100 %, lo stesso virus negli Istituti d'origine (Torino per il virus fisso di Sassari, Napoli per quello di Messina e Palermo) dà soltanto una mortalità del 66 % (Torino) e 33 % (Napoli).

Il virus fisso dell'Istituto antirabico di Sassari, a differenza di quello di Roma e forse di tanti altri Istituti inoculato sotto cute, uccide quasi tutte le cavie e gran parte dei conigli, dei cani e dei gatti. Sarebbe interessante il provare a questo riguardo anche il virus di altri Istituti.

e) Virus fisso degli Istituti antirabici di Bologna (1), Napoli e Milano, che diedero tutti una mortalità del 0 % (2).

I vari autori che hanno sin qui sperimentato col virus fisso non si sono molto preoccupati nella scelta del medesimo come se non vi potesse essere differenza da un virus fisso all'altro: ognuno ha sperimentato col suo.

Le su esposte esperienze insegnano ora che avanti d'iniziare uno studio col virus fisso è necessario assaggiarne la virulenza inoculandolo nei vari animali d'esperimento per varie vie e di procurarsi il virus più adatto allo scopo. Bisognerà, in una parola, procedere come si fa sperimentando coi microrganismi patogeni.

V.

Diluizione massima del virus fisso fresco e del virus di strada col quale si può ancora ottenere la rabbia per inoculazioni ipodermiche e subdurali.

Secondo Högyes l'inoculazione subdurale di virus fisso all'1 : 5000 non sarebbe costantemente mortale pei conigli ed all'1 : 10,000 non lo sarebbe mai.

Secondo Nitsch, invece, iniettandone 1-2 cmc. si avrebbe la morte nei conigli anche colla diluizione 1 : 10,000 (3).

Ora per stabilire il limite massimo di diluizione del virus rabido che può ancora uccidere di rabbia, ciò che può essere importante conoscere quando si tratta di provare un virus putrefatto o contenente sostanze chimiche nocive tollerabili sotto dura solo se molto diluite, sia quando si tratta di stabilire un confronto tra la sensibilità dei cani, dei conigli e delle cavie inoculati sotto dura, con i muridi inoculati sotto cute, istituii varie esperienze delle quali riporto soltanto i risultati.

Basandoci sulla diluizione massima e quindi rispettivamente sulla dose minima mortale, risultò:

1° Che le cavie inoculate sotto dura col virus fisso di Sassari

---

(1) Ricordo però che questo virus giunse quasi secco e che non venne esperimentato che su 5 topolini bianchi.

(2) Per il virus fisso di Milano questa percentuale ha poco valore, perchè non morirono neppure i conigli inoculati sotto dura. L'esperienza verrà ripetuta.

(3) Per iniettare una sì forte quantità di liquido sotto dura senza che fuori esca, il Nitsch pratica un piccolo foro nel cranio ed usa un grosso ago di siringa, il quale turi il buco praticato, affondando poi l'ago per 1-1 ½ cm.

si mostrarono non molto più sensibili dei muridi inoculati collo stesso virus sotto cute, inquantochè mentre i muridi morirono colla diluizione all'1 : 50,000, le cavie soccombettero anche colla diluizione all'1 : 60,000.

2° Che la sensibilità dei muridi fu presso a poco uguale a quella dei conigli inoculati sotto dura.

3° Che i muridi si mostrarono più sensibili dei cani; infatti nessuno dei cani morì dietro inoculazione subdurale di virus fisso all'1 : 50,000 e ne morì uno solo dei due inoculati coll'emulsione all'1 : 40,000.

4° Le cavie furono più sensibili non solo dei cani, ma anche dei conigli. I cani si mostrarono i meno sensibili di tutti gli altri animali inoculati nelle suesposte condizioni di esperimento.

5° Colla diluizione all'1 : 30,000-40,000-50,000 si ebbe nei muridi, sempre per inoculazione sottocutanea, una mortalità del 92 % mentre per le cavie, conigli e cani presi insieme inoculati per via subdurale colle stesse diluizioni, si ebbe una mortalità del 61 %. Quindi sotto quest'altro punto di vista, i muridi inoculati sotto cute sarebbero stati più sensibili degli altri animali inoculati sotto dura.

6° Contrariamente ai risultati ottenuti dall'Högyes, i conigli, come pure le cavie possono soccombere di rabbia anche se inoculati con virus fisso nella diluizione a 1 : 60,000.

7° Il periodo d'incubazione mentre si dimostrò regolare colle diluizioni da 1 : 100 a 1 : 5000, divenne molto irregolare con le diluizioni maggiori.

Di fatti si ebbe:

Coll'emulsione all'1 : 10,000 la morte in 9-10-13 e persino 29 giorni;

Coll'emulsione 1 : 20,000 in 12 giorni;

Coll'emulsione 1 : 30,000 in 24 giorni;

Coll'emulsione 1 : 40,000 in 22-24 giorni;

Coll'emulsione 1 : 50,000 in 22-25 giorni.

Riguardo poi al virus di strada nella diluizione all'1 : 40,000 si ebbe la morte in 20 giorni ed all'1 : 50,000 in 15 giorni.

Quindi la diluizione del virus prolungherebbe il periodo di incubazione presso a poco ugualmente sia che si tratti di virus fisso che di virus di strada.

8° Il fatto che la dose minima mortale del virus fisso e quella del virus di strada sono presso a poco uguali (1 : 50,000) potrebbe forse dimostrare: *a*) che il numero di germi delle due specie di virus che si trovano nella stessa quantità di encefalo è presso a

a poco uguale; *b*) che la differenza tra i due virus non sta quindi nel diverso numero di germi; *c*) che se detta differenza dipende di un diverso ciclo del supposto parassita, questa diversità di ciclo non sarebbe accompagnata da un cambiamento nel numero totale di germi; *d*) peraltro se anche il numero de' germi fosse uguale nel cervello di animali morti tanto per virus fisso che per virus di strada, non bisogna dedurne assolutamente l'uguaglianza nella rapidità di sviluppo dei due virus.

Molto probabilmente lo sviluppo nel sistema nervoso è più rapido pel virus fisso che pel virus di strada, ma alla morte dell'animale. quando l'invasione per parte del virus è completa, il numero dei germi potrebbe venire grossolanamente uguagliato. Potrebbe avvenire nè più nè meno di quello che accade di due culture microbiche in brodo, l'una a sviluppo rapido e l'altra a sviluppo lento. Quella a sviluppo rapido arriva molto più presto dell'altra al massimo di sviluppo, ma giunte a questo punto il numero dei germi tende in entrambe ad uguagliarsi.

VI.

Sino a qual grado d'attenuamento secondo il metodo Pasteur il virus fisso di Sassari uccide ancora i muridi.

Come è noto, nelle vaccinazioni antirabbiche col metodo Pasteur, si arriva sempre ad iniettare l'emulsione del midollo di 3ª giornata.

Ora abbiamo però noi l'assoluta certezza che l'inoculazione dell'emulsione di midollo di 3ª giornata non possa mai produrre la rabbia paralitica nell'uomo?

Possono precedenti iniezioni di emulsione di midolli più attenuati immunizzare contro il midollo di 3ª giornata, qualora questo in qualche caso conservasse la sua virulenza?

Io credo che, pur tenendo conto delle conoscenze che si hanno su tale proposito, queste due domande siano sempre pur lecite e che l'importante quistione non si possa ritenere senz'altro risolta.

Intanto Pasteur scrive che il midollo disseccato a 23°-25° ha perduto la sua virulenza dopo 4-5 giorni, e Gamaleia che il midollo disseccato perde la sua virulenza dopo 5-6 giorni.

Il midollo di conigli di piccola mole perde la virulenza in 3 giorni; quello di conigli grossi in 4. Perciò i midolli di 4-5 giorni seccati a 22°-23° potrebbero ancora conservare la loro virulenza.

Sempre secondo Pasteur, poi il midollo di 6 giorni ucciderebbe

dopo un'incubazione di 15 giorni; quello di 4-5-3 giorni dopo un'incubazione di 8 giorni e quello di 2 e di un giorno avrebbe la stessa virulenza del midollo fresco.

Ora, come si vede, secondo il Pasteur sarebbe quasi certa la possibilità dell'infezione non soltanto col midollo di 3ª giornata, ma anche con midolli più attenuati (1).

Secondo Frisch poi ancora, il midollo di 3-4 giorni sarebbe talora virulento; il midollo di 6ª e 7ª giornata avrebbe ucciso una volta coll'incubazione di 8 giorni; il midollo di 8ª giornata avrebbe ucciso di rabbia una volta in 11 giorni; quello di 10ª e 12ª giornata una volta in 8 giorni; quello di 15ª giornata in 10 giorni; quello di 16ª giornata una volta in 15 giorni. Generalmente però il midollo di 15 giorni a 20° non è più virulento.

Come si vede, secondo i predetti AA. il midollo di 3ª giornata sarebbe tutt'altro che innocuo.

Il Frisch poi istituì persino apposite ricerche per dimostrare che la semplice vaccinazione alla Pasteur può uccidere di rabbia animali sani e l'esplicita sua conclusione fu che la semplice immunizzazione col metodo Pasteur gli uccise il 90 % dei conigli e che questo trattamento potrebbe uccidere anche uomini sani.

Quantunque gli strabilianti risultati del Frisch non siano stati confermati, pure la dimostrazione assoluta che il midollo di 3ª o 4ª giornata non possa uccidere di rabbia individui sani non è ancora data, anzi qualche caso di rabbia paralitica che capita quà e là nei vaccinati col metodo Pasteur vale pur troppo a mantenerci nel dubbio.

Contro i risultati del Frisch ricorderò che Ferran vaccinò più di millep ersone coll'emulsione di virus fisso fresco senza alcun incidente.

Che Wyssokowicz (2) iniettò impunemente dell'emulsione di virus fisso nelle vene a 70 individui; che Nitsch (3) s'inoculò sotto la cute del ventre 5 millimetri di midollo fresco senza avvertire disturbi di sorta.

Che mentre non sono rari i casi di rabbia contratti da veterinari sezionando carogne di animali morti per virus di strada, non si osservò mai in tanti anni nessun caso di rabbia per infezione da virus fisso, quantunque frequentissime siano le inoculazioni accidentali che si hanno nel personale dei numerosi Istituti antirabbici.

---

(1) Secondo lo spessore del midollo, la temperatura, la quantità di potassa e la grandezza del vaso, varia, come ho potuto accertarmi molte volte, la rapidità del disseccamento e conseguentemente l'attenuazione del virus.

(2) Citato da Krasmitski (Annales de l'Institut Pasteur, 1902).

(3) Wien. Kl. Woch., 1904, n. 26.

Viceversa a sollevare nuovamente il dubbio concorre, ripeto, non solo qualche caso di rabbia paralitica che capita di tanto in tanto nei vaccinati col metodo Pasteur, ma più ancora il fatto doloroso accaduto al Bareggi (1), il quale vaccinando degli individui con virus fisso fresco, che in quel tempo non era neppure come l'attuale molto adattato al coniglio, ebbe nientemeno che 5 decessi. In questi 5 individui tuttavia si sarebbe osservato accanto alla paralisi degli arti inferiori anche febbre, mal di capo e vomito.

Che non si possa e che non si debba poi assolutamente contare sull'azione delle iniezioni immunizzanti dei midolli che precedono quello di 3ª giornata risulta da numerose esperienze.

Io pure ho potuto dimostrare ampiamente essere oltremodo difficile immunizzare animali infettati con virus fisso sia pure per via sottocutanea.

Ad ogni modo ho creduto bene di riprendere lo studio di questa quistione.

Ecco i risultati delle varie esperienze istituite in proposito.

Dalle numerose ricerche istituite su 71 muridi, risultò che il virus fisso dell'Istituto antirabbico di Sassari di 3ª giornata iniettato ripetutamente anche in grande quantità per via sottocutanea ad animali oltremodo recettivi (quali sono i muridi) al virus fisso suddetto, si mostrò costantemente destituito di qualsiasi virulenza. Tutti gli animali sopravvissero.

VII.

Sul prolungamento del periodo d'incubazione del virus rabico in diverse condizioni.

Lo studio del prolungamento del periodo d'incubazione nella rabbia sperimentale può interessare non solo come fatto in sè, ma può anche contribuire a decidere la quistione tanto discussa, cioè se questo fatto dipende da un indebolimento del virus o da una diminuzione numerica del medesimo.

La maggioranza degli autori (Pasteur, Högyes, ecc.) spiegano il prolungamento del periodo d'incubazione ammettendo una diminuzione numerica dei germi.

Avanti di passare alla discussione di quest'argomento riporterò i risultati delle esperienze da me istituite in proposito.

(1) Gazzetta med. lombarda, 1889.

Il prolungamento del periodo d'incubazione si ebbe:

a) mediante la diretta diluizione del virus;

b) mediante la filtrazione del virus (diluizione indiretta);

c) mediante il trattamento del virus con sostanze chimiche;

d) mediante l'aumento di resistenza degli animali (vaccinazione).

Ecco i risultati ottenuti:

a. — *Prolungamento del periodo d'incubazione mediante la diluizione del virus.*

1° La diluizione del virus fisso dall'1: 10,000 all'1: 60,000 ebbe per conseguenza un ritardo nel periodo d'incubazione che oscillò dai 3 ai 22 giorni.

2° Il prolungamento del periodo d'incubazione andò sino ad un certo punto di pari passo col grado di diluizione, inquantochè il maggior ritardo si ebbe nella diluizione dell'1 : 50,000 con una media di 15 giorni. È da notare però che nella diluizione all'1: 10,000 si ebbe, in un caso, un ritardo di 22 giorni.

3° Nella diluizione all'1: 50,000 il periodo d'incubazione oltre che maggiore fu anche più costante, inquantochè si ebbero nei vari casi rispettivamente dei ritardi di 20-15-10 giorni, mentre colla diluizione all'1: 10,000, p. es. si ebbero maggiori sbalzi come 3-6-22 giorni.

b. — *Prolungamento del periodo d'incubazione mediante la filtrazione del virus.*

1° Il virus fisso filtrato con un filtro ad uno strato diede, in 10-19 animali un ritardo da 2 a 8 giorni (in media di 3 giorni circa); 9:19 animali morirono senza ritardo.

2° Il virus fisso filtrato con un filtro a 2 strati diede in 5:9 animali un ritardo da 5 a 17 giorni (in media 6 giorni circa); 4:9 animali morirono senza ritardo.

3° Il virus fisso filtrato con un filtro a 3 strati diede in 4:9 animali un ritardo da 6 a 12 giorni (in media di 8 giorni); 5:9 animali morirono senza ritardo.

4° Il virus fisso filtrato con un filtro a 4 strati, esperimentato su un solo animale, diede un ritardo di 6 giorni.

c. — *Prolungamento del periodo d'incubazione mediante il trattamento del virus con sostanze chimiche.*

1° Produssero più facilmente una maggior durata del periodo d'incubazione le seguenti sostanze:

Larycith, acido fenico e bisolfato di chinino, che diedero persino un ritardo di 10-12 e 9 giorni.

Tutte le altre sostanze non diedero che un ritardo di 2-5 giorni.

2° Non produssero alcun ritardo le seguenti sostanze:

Fluoruro sodico, ammoniaca, ioduro potassico, iodalbacid, argento colloidale, argonina, tachiolo, ittargano, nitrato d'argento, largina, ermofenile, bleu di metilene.

d. — *Prolungamento del periodo d'incubazione mediante l'aumento di resistenza degli animali.*

Dalle molte esperienze istituite in proposito risulta che vaccinando gli animali si riuscì, su circa 70 di questi a ritardare il periodo d'incubazione da 2 a 14 giorni (in media 7 giorni circa).

Che l'aumento o la diminuzione del periodo d'incubazione possa dipendere oltre che dalla quantità del virus iniettato, cioè da una modificazione numerica del medesimo, anche da una modificazione della virulenza, risulta dai numerosi fatti raccolti già nella mia nota sulla virulenza del virus fisso da vari Istituti antirabici.

Ricorderò a questo proposito:

1° La maggior virulenza del virus dei lupi su quella di tutti gli altri animali.

2° La varia virulenza constatata dai vari AA. e da me nel virus di strada e nel virus fisso, inoculato, quest'ultimo, non solo sotto cute, ma anche sotto dura.

3° Il fatto stesso della trasformazione del virus di strada in un virus più virulento quale è il virus fisso.

D'altra parte non è improbabile che vi siano alcuni agenti chimici che possano, accanto ad una diminuzione numerica, produrre anche un vero e proprio attenuamento del virus.

Ora se il prolungamento del periodo d'incubazione ottenuto mercè le sostanze chimiche dipendesse soltanto da una diminuzione numerica del virus, l'iniezione di maggior quantità del medesimo dovrebbe uccidere in tempo regolare.

Su tale argomento instituirò, in seguito, qualche esperienza.

VIII.

Comportamento del virus rabido e di altri microrganismi verso i filtri di carta svedese a vari strati.

A. — *Sul passaggio del virus rabido attraverso filtri di carta svedese ad uno e più strati.*

Circa 8 anni fa, insieme ad altre ricerche sulla rabbia, ne istituii qualcuna sul passaggio del virus rabido attraverso filtri di carta ad uno e più strati.

Una piccola parte di queste ricerche trovasi in una tesi fatta nel 1898 sotto la mia direzione dal laureando Guzzardi, nell'Istituto d'igiene della regia Università di Roma, mentre le altre vennero condotte a termine negli anni susseguenti.

Lo scopo era di vedere se il virus rabido attraversava i filtri in discorso, ciò che avrebbe potuto servire per studiarne meglio la natura e per spiegare il prolungamento spesso molto pronunciato del periodo d'incubazione, che verificavasi in seguito all'infezione mediante virus filtrato.

Il piano delle ricerche fu il seguente:

a) Filtrazione dell'emulsione di virus fisso 1 : 500 a un filtro di carta di 1, 2, 3, 4 e 6 strati.

b) Virulenza del residuo del filtrato evaporato a 30°.

c) Filtrazione attraverso il filtro Chamberland dei filtrati ottenuti coi filtri di carta e prova della virulenza del residuo raccolto sulla candela.

d) Prova della virulenza del precipitato alcoolico dei filtrati ottenuti col filtro di carta.

Le ricerche in discorso furono istituite su 57 animali (43 conigli, 3 cani e 11 ratti).

La virulenza del filtrato fu provata sui conigli e sui cani per via subdurale e sui ratti per via sottocutanea.

Le esperienze del 1898 furono istituite con virus fisso dell'Istituto antirabico di Roma e quelle dal 1899 in poi col virus fisso dell'Istituto antirabico di Sassari.

Tralasciando per brevità le esperienze, ne riporto qui soltanto i risultati.

1° 5 conigli inoculati per controllo con virus non filtrato morirono tutti di rabbia dopo 6 giorni.

2° Di 11 conigli inoculati col filtrato ottenuto con un filtro di carta di un solo strato, 1 morì al sesto giorno, 4 morirono tra il settimo e l'ottavo, 3 morirono al nono, 2 al decimo giorno, 1 all'undicesimo e l'altro al quindicesimo arrivando così ad un ritardo anche di 8-9 giorni.

3° Di 7 conigli inoculati col filtrato ottenuto con un filtro di carta di due strati, 2 morirono all'ottavo giorno, 1 al dodicesimo, un altro al tredicesimo e 3 vivevano ancora dopo 20-23 giorni.

4° Dei 2 conigli inoculati col filtrato ottenuto con un filtro di carta a 3 strati, uno morì dopo 8 e l'altro dopo 13 giorni.

Un ratto iniettato sotto cute morì dopo 13 giorni.

5° Di 2 ratti inoculati col filtrato ottenuto con un filtro a 4 strati, uno sopravvisse e l'altro mori dopo 13 giorni.

6° Un coniglio inoculato col residuo del filtrato a 2 fogli ed evaporato a 30°, morì dopo 31 giorni con sintomi incerti di rabbia.

7° Mentre 7 conigli inoculati col residuo rimasto in seconda filtrazione sulla candela Chamberland morirono in 8 giorni ed uno persino in 5; 2 altri trattati collo stesso residuo morirono dopo 19 giorni e altri 2 ancora dopo 24 giorni, con un ritardo perciò di 12-17 giorni.

8° Quattro conigli, inoculati ciascuno col precipitato alcoolico di filtrati ottenuti con filtri di carta ad 1, 2 e 3 strati, sopravvissero (1).

B. — *Passaggio di microrganismi ed amebe attraverso filtri di carta svedese a uno e più fogli*

Riporterò qui, nelle eventualità che possano servire, i risultati di alcune vecchie ricerche da me istituite sino dal 1898 colla collaborazione dello studente Guzzardi riguardanti il passaggio di microrganismi ed amebe attraverso filtri di carta svedese.

Ecco i risultati delle varie esperienze:

1° Riguardo agli schizzomiceti si trovò che non solo gli esili bacilli, piocianeo e prodigioso, ma anche il grosso e filamentoso bacillo del fieno attraversarono filtri di carta svedese anche di 8 fogli, quantunque in numero enormemente più piccolo di quelli che attraversarono un filtro di un foglio.

2° Che i blastomiceti e precisamente tanto i saccaromiceti che gli oidi attraversano ancora filtri di 5 fogli e vengono trattenuti quasi completamente da filtri di 8 fogli.

3° Le spore degli ifomiceti (*aspergillus niger*), sia sospese in acqua semplice che in liquidi dai quali vengono bagnati completamente (acqua con ammoniaca o etere e glicerina), passarono in numero scarso anche da filtri di un foglio e vennero trattenuti quasi completamente da filtri di 3-5 fogli.

4° Le amebe si comportarono presso a poco come i blastomiceti, inquantochè attraversarono in numero scarso il filtro di 5 fogli e vennero trattenute dal filtro di 8 fogli.

---

(1) Bertarelli e Volpino osservarono pure un ritardo nel periodo di incubazione nei conigli inoculati con virus filtrato. (Rivista d'igiene, anno XIV, 1903, pag. 10).

IX.

Il liquido cefalo rachidiano di animali rabidi non è virulento.

Pasteur (1) sosteneva la virulenza del liquido cefalo-rachidiano di animali rabidi. Certamente che una volta che il virus rabido vive quasi esclusivamente nel sistema nervoso e che consiste in un agente filtrabile sarebbe, almeno a prima vista, più da meravigliarsi per la sua assenza che per la sua presenza nel liquido cefalo-rachidiano. Tuttavia Wyssokovicz (2) e Lesieur (3) non trovarono virulento il liquido cefalo rachidiano di sei uomini e due cani.

Metodo di ricerca. — È indispensabile seguire un rigoroso metodo nella estrazione del liquido cefalo-rachidiano in modo da evitare, nell'estrarlo con una siringa, di urtare colla punta dell'ago di questa il midollo.

1° Si principierà col mettere completamente a nudo un'estensione sufficiente di midollo cervicale.

2° Col liberare le meningi in detto punto completamente da ogni aderenza in modo da poter vedere a traverso le medesime il sottostante midollo.

3° S'introdurrà la punta dell'ago nel modo più tangenziale possibile; appena introdotta una parte della punta, si dovranno sollevare le meningi in modo da staccarle ben bene dal midollo a mo' di borsa ove si raccoglierà in maggior quantità il liquido cefalo-rachidiano.

4° S'introdurrà solo la punta dell'ago ed anche una sol volta contentandosi della prima porzione di liquido estratto. Si dovrà evitare possibilmente l'aspirazione, che può produrre la fuoruscita di sangue.

5° Si sperimenterà soltanto col liquido limpidissimo e soltanto per confronto con quello torbido o sanguinolento.

Si dovrà inoltre esperimentare col liquido cefalo-rachidiano di un forte numero di animali morti per virus fisso e per virus di strada onde eliminare qualche caso positivo che potrebbe rappresentare soltanto un errore di tecnica.

Dalle ricerche istituite su 43 animali risulta:

1° Che il liquido cefalo-rachidiano di animali morti per virus fisso o per virus di strada non è, come voleva Pasteur, infettivo quando viene estratto con tutte le cautele per non asportare sostanza nervosa.

2° Probabilmente il virus rabido anche iniettato direttamente nel liquido cefalo-rachidiano *intra vitam* non vi si moltiplica e probabilmente non vi si conserva lungo tempo.

---

(1) Bull. de l'Acad. de méd. du 31 mai 1881, pag. 718.
(2) Central. f. Bakt., vol. X, p. 35, 1891.
(3) Compt. Rend. de la Soc. de Biol., 1904, n. 33. Centr. f. Bakt. Ref., anno 1905, pag. 377.

X.

Sulla virulenza della saliva e delle glandole salivari degli animali rabidi.

Sia per la minore difficoltà che presenterebbe la ricerca e lo studio dell'agente specifico della rabbia in un liquido quasi privo di elementi morfologici, qual'è la saliva, sia per l'interesse che lo studio desta pur sempre il fatto singolare del passaggio del virus rabido dal sistema nervoso nella saliva, credetti fosse il caso di istituire qualche ricerca in proposito.

Le cognizioni che si hanno a questo riguardo sono molto incerte, come risulta da questi pochi cenni storici:

Zinke dimostrò pel primo nel 1804 l'infettività della saliva.

Huzard e Dupuy affermarono che la saliva degli erbivori non era virulenta. Quest'opinione fu accettata sino al 1822, quando Berndt di Greifswald sostenne che la saliva di tutti gli animali rabidi era virulenta. Da questo momento le ricerche si moltiplicarono. Le esperienze di Magendie confermarono la virulenza costante della saliva dei carnivori.

Hertwig (1) nel 1828, dimostra la virulenza della saliva della parotide, ed inoculando cani con bava di cani rabbiosi trasmette la rabbia 6 volte su 21, cioè nel 28 %.

Nocard nel 1880 e P. Bert nel 1882, dimostrarono che il virus rabido contenuto nella saliva viene trattenuto dal filtro.

La sottomascellare e la sottolinguale, secondo Pasteur e Galtier, sarebbero incostantemente virulenti; quest'ultimo A., infatti, inoculando parecchie volte il secreto delle due glandole salivari e qualche frammento di esse, non ottenne risultato positivo.

Per altro queste esperienze sulle glandole sono state fatte mediante iniezione sottocutanea, via questa oltremodo incerta nella trasmissione della rabbia per gli animali d'esperimento allora usati.

P. Bert (2) ottenne risultato negativo dalla saliva della parotide e dalla mascellare del cane.

Renault ottenne risultato positivo nella proporzione dell'1 : 4.

Zagari ricordò 32 casi innocui di morsi da uomo a uomo.

La saliva di uomini idrofobi inoculata sotto dura a cani diede risultati negativi (Bernard, Gautier).

Dupuy non riuscì a trasmettere la rabbia a vacche e pecore anche fregando sopra ferite praticate in esse con una spugna fatta mordere da animali idrofobi della medesima specie, mentre la rabbia producevasi facendo

(1) Hertwig. Hufeland's Journal f. prakt. Heilkunde 1828.

(2) P. Bert. Compt-Rend. de l'A. d. Sciences, 1882, vol. 295.

la stessa prova da cane a cane. Egli osservò eziandio che negli armenti, dove l'idrofobia si era sviluppata sopra un certo numero di animali morsicati da cani, questi erbivori idrofobi non comunicarono la malattia nei loro compagni ad onta che li morsicassero fortemente anche sulle parti tosate.

Bertarelli e Volpino (1) e Remlinger ottennero risultati negativi nei conigli colla saliva di due fanciulli idrofobi.

Dopo la pubblicazione della mia prima nota preventiva nella *Riforma Medica* (loc. cit.), che conteneva anche i risultati da me ottenuti sulla virulenza della saliva di animali rabbiosi, il Galli Valerio avrebbe trovato 3 volte su 6 virulenta la saliva e le glandole salivari di ratti rabidi (2).

La prima quistione a decidere era quella di stabilire in quali animali e in quali forme di rabbia si possa dimostrare la costante presenza del virus rabido.

Avanti che io conoscessi la grande sensibilità dei ratti e dei topolini al virus rabido per via sottocutanea, non mi era ancora possibile questo studio o almeno molto difficile inquantochè gli animali inoculati sotto cute non muoiono quasi mai di rabbia; nell'occhio e nei nervi incostantemente e sotto dura invece inoculati di saliva soccombono non di rado d'infezione.

Per simile studio era quindi indispensabile un animale che fosse oltremodo recettivo al virus rabido per via ipodermica e che fosse molto resistente alle infezioni microbiche, come appunto è il caso dei ratti specialmente albini, sensibili tanto al virus fisso dell'Istituto antirabico di Sassari, che al virus di strada sino nella diluizione all'1 : 50,000.

Le esperienze vennero condotte nel modo seguente:

1° Si istituirono esperienze con saliva e glandole salivari di animali morti, sia per virus fisso, che di virus di strada.

2° Si esperimentò con saliva di cani, conigli, agnelli e ratti.

3° Le inoculazioni vennero fatte sotto dura, nella cornea, nello sciatico e sotto cute.

4° La saliva venne ottenuta ora raccogliendo la bava, ora sciacquando la bocca dell'animale ed ora producendo il ptialismo mediante iniezioni di pilocarpina.

5° La raccolta della saliva sui cani rabidi *intra vitam* si faceva immobilizzandoli previa iniezione di morfina.

Tralascio per brevità la lunga serie di esperienze istituite su 185 animali e ne riporto soltanto i risultati:

1° La saliva di 20 cani morti per rabbia da virus fisso e di

(1) BERTARELLI e VOLPINO. Centr. f. Bakt., 30 novembre 1903.
(2) GALLI VALERIO. Centr. f. Bakter. I, Abth. XL, 1905, fasc. 2.

altri 5 cani morti di rabbia da virus di strada, inoculata per via subdurale e sottocutanea a 13 cani, 13 conigli, 8 ratti e 42 topolini, diede sempre risultati negativi.

2° La saliva di 7 conigli morti di rabbia da virus fisso e di altri 7 conigli morti di rabbia da virus di strada, inoculata per via subdurale e sottocutanea a 3 cani, 3 conigli e 26 ratti, non si mostrò mai virulenta.

3° La saliva di agnello morto di rabbia per virus di strada, inoculata a 6 ratti, diede risultati pure negativi.

4° La saliva di 10 ratti morti di rabbia da virus di strada inoculata a 36 topolini, non uccise mai di rabbia.

5° Le glandole sottomascellari di 10 ratti morti di rabbia prodotta da virus fisso e da virus di strada, inoculata a 35 topolini non si mostrarono mai infettive.

6° Due ratti ed un topolino fatti sicuramente mordere da un ratto affetto da vera rabbia furiosa non contrassero la rabbia.

Conclusione. — La saliva e le glandole salivari di cani, conigli, ratti, topolini e di un agnello morti di rabbia muta da virus fisso e da virus di strada non fu trovata mai virulenta.

Quindi, mentre non si può negare l'infettività della saliva di animali affetti da rabbia furiosa, siano questi cani, gatti, lupi, non si può che eccezionalmente, o per lo meno molto incostantemente, dimostrare l'infettività della saliva di animali affetti da rabbia muta prodotta da virus fisso e da virus di strada.

Con la constatazione di questo fatto cadono le speranze riposte nella saliva degli animali rabidi per studiare l'agente specifico della rabbia fuori del sistema nervoso.

XI.

Se l'urina di animali rabidi è virulenta.

Il fatto che il virus rabido si trova soltanto nel sistema nervoso e che manca, come ho dimostrato in altro lavoro, persino nel liquido cefalo-rachidiano, lascerebbe prevedere una risposta negativa, senonchè la filtrabilità del virus rabido ed il suo passaggio, quantunque inconstante, nella saliva sono dei fatti che ne rendono non completamente improbabile la comparsa nell'urina.

Gli autori che si sono occupati di quest'argomento non sono d'accordo.

Bouchard nel 1881 avrebbe trasmessa la rabbia con urina albuminosa.

Di Mattei (1) avrebbe ottenuto risultato positivo iniettando 10-15 cmc. di urina di animali rabidi nel peritoneo di animali recettivi.

Secondo il Bébi (2) l'urina di animali idrofobi non è infettiva e non trasmette mai la rabbia qualunque sia la via d'inoculazione, ed inoculando a delle cavie sotto dura 1 cmc. di emulsione acida di virus fisso fresco di coniglio mescolato con urina umana e tenuto per 24 ore in ghiacciaia, per evitare la fermentazione ammoniacale, non contrassero la rabbia. Secondo questo autore, il virus fisso verrebbe distrutto dall'urina per azione dell'acidità della medesima.

Siccome pur passando il virus rabido nell'urina quello non si potrebbe trovare in questa che nella massima diluizione e sarebbe quindi indispensabile inoculare forti quantità di urina sospetta per rintracciarlo, così mi sembra che la scelta fatta dal Bébi della cavia come animale d'esperimento e della via subdurale, non sia stata troppo fortunata.

Difatti il Bébi non potè inoculare altro che 1 cmc. di urina raggiungendo anche secondo me, un'abilità non comune, meravigliandomi che le cavie abbiano potuto sopportare tanto..

Ora se il virus rabido si trovava nella urina sospetta in fortissima diluizione (1 : 60.000 p. es.) questo, come risulta da mie esperienze, non sarebbe stato più dimostrabile.

Non dimentichiamo poi che l'urina esperimentata essendo acida avrebbe già dovuto di per sè stessa distruggere gran parte del virus.

L'importante questione attendeva quindi ancora di essere risolta, ciò che tentai di fare con apposite ricerche.

Ecco come procedetti:

1. Gli animali d'esperimento furono cani, conigli, ratti e topolini albini e neri.

2. Si esperimentò coll'urina di animali morti tanto per virus fisso che per virus di strada.

3. S'iniettò l'urina tanto sotto cute che sotto dura, come nel peritoneo.

4. Si praticarono iniezioni non soltanto in forte quantità, ma anche quotidianamente per parecchio tempo sempre sullo stesso animale.

5. Si esperimentò pure con l'urina di cani, conigli e ratti, che qualche giorno prima della morte erano stati iniettati nel peritoneo con fortissime quantità d'emulsione di virus fisso (sino a 100 cmc. nei cani).

---

(1) Di Mattei. Gazzetta degli ospedali, n. 103, anno 18.

(2) Bébi. *Sulla non esistenza del virus rabido nell'urina degli animali idrofobi* (Nota preventiva 5 ottobre 1897).

6. Anche per evitare l'obbiezione che il virus rabido fosse stato distrutto dall'urina stessa, si studiò pure l'azione dell'urina dei vari animali sul virus rabido.

Tralasciando qui per brevità le esperienze, riporto soltanto i risultati.

1. Dalla numerosa serie di esperienze istituite su 204 muridi risultò che l'urina di cani, di conigli, di ratti e di topolini morti sia per virus fisso che per virus di strada non fu trovata mai virulenta.

2. Che non si potè dimostrare virus rabido neppure nelle urine di animali rabidi iniettati anche per via ipodermica ed intraperitoneale con forti quantità di virus fisso.

3. Che l'urina dell'uomo sano e di cani, conigli e ratti rabidi e sani sulla proporzione di 5, 5 su 5 cmc., tenuta per mezz'ora od un'ora alla temperatura di 37°, non distrusse il virus rabido.

Rimarrebbe forse ancora da studiare il comportamento di tracce di virus rabido nell'urina prolungandone anche il contatto per un tempo maggiore.

XII.

Azione di vari agenti chimici sul virus rabido (1).

La conoscenza della quantità minima lissicida dei vari composti chimici ci è ancora ignota completamente e ciò si spiega da una parte colla mancanza di animali recettivi alla rabbia per via sottocutanea e dall'altra col forte numero di costosi animali (conigli o cavie), che avrebbe richiesto un simile lavoro.

I vari AA. si sono dovuti contentare di determinare soltanto in quanto tempo una data soluzione di una sostanza chimica è capace di distruggere il virus rabido.

Allo scopo quindi, sia di completare il capitolo relativo all'azione lissicida dei vari agenti fisico-chimici, sia per tentare d'illuminarci sulla natura del virus rabido e dalla differente resistenza del medesimo verso i detti agenti confrontato a quello dei noti microrganismi, sia perchè la conoscenza della dose minima lissicida delle varie sostanze chimiche mi doveva servire per poter istituire alcune ricerche sull'immunizzazione e sulla cura della rabbia, studiai l'azione della

(1) Il lavoro completo è stato pubblicato dalla Tip. ed. degli Olmi, Scansano, 1906.

serie di sostanze chimiche prevalentemente antisettiche sul virus rabido.

Tralasciando per brevità la lunghissima serie di esperienze colle relative tabelle riassuntive, riporto i seguenti risultati.

1. L'acido acetico uccide in un quarto d'ora il virus fisso già nella proporzione di 1 : 675, mentre il virus rimane ancora attivo nella proporzione di 1 : 1300.

2. L'acido salicilico uccide in un quarto d'ora all' 1 : 1020, non uccide all' 1 : 1346.67.

3. L'acido citrico uccide in un quarto d'ora all'1 : 675, non uccide all' 1 : 1300.

4. L'acido lattico uccide in un quarto d'ora all' 1 : 675, non uccide all' 1 : 10,100.

5. L'acido cloridrico uccide il virus all' 1 : 5,100 e non l'uccide all'1 : 10,100.

6. Il permanganato potassico uccide in un quarto d'ora all'1 : 520, non uccide all' 1 : 686,67.

7. L'allume uccide in un quarto d'ora all' 1 : 93.33, non uccide all' 1 : 110.

8. Il cloruro sodico uccide in un quarto d'ora all' 1 : 8.67, non uccide all' 1 : 12.

9. Il fluoruro sodico uccide in 30 minuti all' 1 : 766.67, non uccide all' 1 : 1100.

10. Il carbonato sodico uccide in un quarto d'ora all' 1 : 105, non uccide all' 1 : 150.

11. L'ammoniaca uccide in un quarto d'ora all' 1 : 2100, mentre non ha potere sul virus all' 1 : 2600.

12. Lo iodio uccide in un quarto d'ora all' 1 : 1350, mentre è inattivo all' 1 : 2600.

13. Lo jodalbacid uccide in 30 minuti all' 1 : 2600, mentre non uccide all' 1 : 5100.

14. Il solfato di rame uccide all' 1 2600, non uccide all' 1 : 5100,

15. Il nitrato d'argento uccide il virus fisso in 30 minuti all' 1 : 3,433 e non uccide all' 1 : 5100 (oppure attivo all' 1 : 13,500 e inattivo all' 1 : 26,000).

16. Il tachiolo uccide in 30 minuti all' 1 : 20,000, non uccide all' 1 : 40,200; (oppure attivo all' 1 : 67,500 e inattivo all' 1 : 180.000).

17. L' Ittargano uccide in 30 minuti all' 1 : 25,500 e non uccide all' 1 : 17,166.67.

18. L'argento colloidale uccide in 30 minuti all' 1 : 10,200, non uccide all' 1 : 22,000.

19. Il protargolo uccide in 30 minuti all' 1 : 1100, non uccide all' 1 : 1350.

20. La largina uccide in 30 minuti all' 1 : 1350, non uccide all' 1 : 2600.

21. L'argonina uccide in 30 minuti all' 1 : 1350, non uccide all' 1 : 2600.

22. Il sublimato uccide in 30 minuti all' 1 : 153,333.34, non uccide all' 1 : 220,000.

23. L'ermofenile uccide in 30 minuti all' 1 : 1350, non uccide all'1 : 2600.

24. L'acido fenico uccide in un quarto d'ora all' 1 : 420 e non distrugge il virus all' 1 : 520.

25. Il timolo uccide in 30 minuti all' 1 : 1550, non uccide all' 1 : 2600.

26. Il lisoformio uccide in 30 minuti all' 1 : 220, non uccide all' 1 : 270.

27. L'alumnolo uccide in 30 minuti all' 2 : 1100, non uccide all' 1 : 1350.

28. L'assaprolo uccide il virus in 30 minuti all' 1 : 1350, non lo uccide all' 1 : 2600.

29. Il bisolfato di chinino uccide il virus fisso in un quarto d'ora all' 1 : 220 e non l' uccide all' 1 : 686.

30. Il cloroformio uccide il virus fisso in un quarto d'ora all' 1 : 67.5 e non l' uccide all' 1 : 130.

31. L'acqua ossigenata uccide il virus in un quarto d'ora all' 1 : 20, mentre non l'uccide all' 1 : 25.

32. Il bleu di metilene uccide il virus fisso in un quarto d'ora all' 1 : 3433.33. mentre non lo distrugge all' 1 : 673333.

33. Il verde di malachite uccide il virus in un quarto d'ora all' 1 : 2600, mentre non l' uccide all' 1 : 3433.33.

34. Il larycith uccide il virus in un quarto d'ora all' 1 : 1100, mentre non l'uccide all' 1 : 13,500.

Conclusioni.

1. L'azione lissicida degli acidi organici, acetico, citrico, lattico fu presso a poco la stessa (attivi dall' 1 : 675 circa ed inattivi all' 1 : 3000 circa). Quella dell'acido salicilico è più elevata (attivo all' 1 : 1020 circa ed inattivo all' 1 : 1346).

2. Più attivi sono alcuni acidi minerali, per esempio l'acido cloridrico distrugge il virus all' 1 : 5100 e non lo distrugge all' 1 : 10,000.

3. Il fluoruro sodico (1 : 766) fu più attivo del permanganato potassico (1 : 520).

4. L'ammoniaca fu molto più attiva (1 : 2100) del carbonato sodico (1 : 105) e il carbonato sodico alla sua volta fu più attivo dell'allume (1 : 93).

5. Il cloruro sodico fra le varie sostanze provate esercitò la minore azione lissicida (1 : 8).

6. Lo iodio esercitò un'azione discretamente energica che fu ancora maggiore del jodalbacid.

7. Il solfato di rame fu più attivo (1 : 2600) dello iodio, del permanganato potassico e dell'acido fenico.

8. Dopo il sublimato alcuni composti d'argento esercitarono l'azione più energica. Tra i detti composti d'argento venne prima il tachiolo (attivo all' 1 : 67,000 e inattivo all' 1 : 130,000). Poscia il nitrato d'argento (attivo all' 1 : 13,500 ed inattivo all' 1 : 36,000); l' ittargano (attivo all' 1 : 13,000 ed inattivo all' 1 : 33,000 circa); l'argento colloidale (attivo all' 1 : 10,200 ed inattivo all' 1 : 22,000). Indi la lar-

gina e l'argonina (attive all' 1 : 1350 ed inattive all' 1 : 2600). In ultimo poi venne il protargolo (attivo all' 1 : 1100 ed inattivo all' 1 : 1350 circa).

9. Il sublimato fra le sostanze provate occupò, naturalmente, il primo posto (attivo all' 1 135,000 ed inattivo all' 1 : 260,000). L'emorfenile, che è pure un composto mercuriale, esercitò un'azione infinitamente più debole (attivo all' 1 : 1350 ed inattivo all' 1 : 2600).

10. L'acqua ossigenata esercitò un'azione lissicida debolissima (attiva all' 1 : 20, inattiva all' 1 : 25).

11. Il cloroformio pure esercitò un'azione molto debole (attivo all' 1 : 67, inattivo all' 1 : 130).

12. Il timolo esercitò un'azione lissicida (attivo all' 1 : 1350 ed inattivo all' 1 : 2600) molto più energica dell'acido fenico (attivo all' 1 : 420 ed inattivo all' 1 : 520) e ancora più dell' isoformio (attivo all' 1 : ed inattivo all' 1 : 270).

13. L'alumnolo e l'asaprolo furono discretamente attivi (alumnolo attivo all' 1 : 1100, inattivo all' 1 : 1330; asaprolo attivo all' 1 : 1350, inattivo all' 1 : 2600).

14. Debole fu l'azione del bisolfato di chinino (attivo all' 1 : 220 ed inattivo all' 1 : 686).

15. Un'azione lissicida relativamente energica la riscontrai in alcuni colori d'anilina e precisamente nel larycith (attivo all' 1 : 11,000, inattivo all' 1 : 13,000) che superò il verde di malachite (attivo all' 1 : 2600, inattivo all' 1 : 3400), ed ancor più il bleu di metilene, che si dimostrò il meno energico dei tre (attivo all' 1 : 340, inattivo all' 1 : 670).

XIII.

Durata della virulenza del virus fisso (dell' Istituto antirabico di Sassari) conservato in glicerina e provato sui muridi inoculati per via sottocutanea.

Sia per conoscere la durata della virulenza del virus fisso di Sassari conservato per vario tempo in glicerina, inoculato per via ipodermica nei muridi, sia per decidere se alcuno dei risultati negativi ottenuti in proposito col virus fisso inviatomi da qualche istituto antirabico del Regno, si dovesse ascrivere alla permanenza del virus fisso in glicerina durante il viaggio, cioè per lo spazio di

5-6 giorni, istituii diverse ricerche, delle quali riporto qui soltanto i risultati:

1. Il virus fisso dell'Istituto antirabico di Sassari conservò la sua virulenza per via ipodermica sui muridi per circa 20 giorni. Nessuno però dei pezzetti di cervello tenuti in glicerina conservò la virulenza fino al 25° giorno. Secondo Rodet (1) e Galavielle ed il Soir, il virus rabico conserverebbe invece la sua virulenza nel coniglio inoculato per via subdurale per 2 mesi.

2. Il periodo di incubazione variò da 5 a 6 giorni, non venendo quindi per nulla prolungato.

3. Non si osservarono differenze nel periodo d'incubazione, sia che la durata dell'azione della glicerina fosse stata di 3 oppure di 20 giorni.

4. Non si trovò alcuna differenza nè nella resistenza del virus, nè nel periodo di incubazione, sia che il virus fosse conservato in glicerina concentrata sia in glicerina all'1 : 2 che all'1 : 4.

5. La virulenza del virus, come avevano già osservato Rodet e Galavielle e recentemente il Soir sul coniglio inoculato per via subdurale, scompare improvvisamente.

XIV.

Azione della cocaina e dell'olocaina sul virus rabico.

Tra i vari mezzi da me provati per rendere il meno doloroso che fosse possibile, specialmente trattandosi di bambini e di donne, le iniezioni di emulsione nella cura Pasteur, trovai come il più efficace e meno costoso quello di aspirare alcune goccie di una soluzione all'1 % di cocaina o di olocaina colla siringa già riempita di emulsione.

Avanti però di porre in pratica questo metodo di anestesia fu mio dovere di assicurarmi se la cocaina e l'olocaina non avessero alcuna azione sul virus rabico.

Siccome sarebbe stato oltremodo lungo e difficile il decidere se le tracce di cocaina o di olocaina venute momentaneamente ed anche parzialmente a contatto colla emulsione di midollo esercitassero un'azione dannosa sul vaccino antirabico, così studiai invece

(1) Rodet et Galavielle. *Bulletin de la Société de Biologie.* Seduta del 5 giugno 1902.

l'azione dei due anestetici sul midollo fresco nelle condizioni surriferite.

Ora le varie esperienze istituite su circa 40 conigli mi dimostrarono che l'aggiunta di 0. 25 cmc. di una soluzione di cocaina o di olocaina al 2 % a 3 cmc. di emulsione di virus fisso fresco non esercita alcuna azione apprezzabile sulla sua virulenza.

Data la piccola quantità di cocaina e di olocaina che quotidianamente poteva venire iniettata nell'uomo, non era il caso di occuparsi della differenza di tossicità fra questi due anestetici. Procedetti quindi senz'altro all'applicazione del metodo nell'uomo.

Accanto ai bicchierini a calice contenenti l'emulsione si teneva pronto un altro bicchierino contenente una soluzione di cocaina o di olocaina preparata e conservata con tutte le cautele antisettiche.

Caricata la siringa si aspirava, avanti di praticare l'iniezione, 0. 15 a 0. 25 cmc. di detta soluzione e si procedeva senz'altro alla iniezione.

Allo scopo di decidere sulla efficacia del processo si praticava in tutti gli individui soggetti alla cura ora l'iniezione con cocaina, ora l'iniezione senza cocaina.

Tutti quanti, quasi senza eccezione e senza che sapessero della modificazione introdotta, avvertivano costantemente la differenza e noi stessi ce ne accorgevamo chiaramente al momento dell'iniezione.

L'innocua e minuscola modificazione introdotta non fu poi possibile abbandonarla ed ora si usa abitualmente da 3 anni senza mai aver avuti inconvenienti di sorta. I buonissimi risultati poi che ha dato sino ad ora l'Istituto antirabico di Sassari dimostrano, quantunque non ve ne fosse bisogno, che le tracce di cocaina e di olocaina usate, come non hanno esercitato alcuna apprezzabile azione sul virus fisso fresco sono state completamente indifferenti sul vaccino. Cosa inutile sarebbe stata istituire ricerche speciali sull'azione della cocaina sul virus attenuato, cioè sul vaccino, avendo io già dimostrato che l'acido fenico, il protargolo, il timolo e tante altre sostanze non ne distruggono e nemmeno ne diminuiscono il potere. Del resto non si aggiungono ai sieri altre sostanze ben più attive delle tracce di cocaina da me provate?

XV.

Sulla distruzione in sito del virus rabico appena avvenuta l'infezione.

Anche dopo le ricerche di Babes, Cabot e Konradi la questione della distruzione locale del virus rabico resta sempre a studiarsi.

Riferirò qui brevemente i risultati delle esperienze istituite in proposito su 130 ratti albini:

A) Infettando dei ratti di virus fisso sotto cute e praticando subito dopo un'incisione in corrispondenza del punto di innesto e lavando quindi la ferita mediante 100 cmc. di una soluzione di una data sostanza chimica, risultò quanto segue:

1° Si salvarono 1 su 2 dei ratti trattati con permanganato potassico 1 : 200; 1 su 2 dei ratti trattati con tachiolo 1 : 5000; 3 su 5 dei trattati con ittargano 1 : 1000; 4 su 6 dei trattati con collargolo 1 : 1000; 3 su 4 dei trattati con protargolo 1 : 200; 1 su dei 2 trattati con sublimato 1 : 10000; 1 su 2 dei trattati con acqua ossigenata pura; 1 su 2 dei trattati con bleu di metilene 1 : 200.

2° Morirono dopo poche ore di intossicazione i ratti trattati con ammoniaca 1 : 250; nitrato argento 1 : 1000; larycith 1 : 1000.

3° Il periodo di incubazione non venne prolungato negli animali che soccombettero di rabbia, tranne che in quelli trattati con collargolo nei quali si ebbe un ritardo di 1-2 giorni soltanto.

4° Gli animali di controllo in numero di 8 morirono tutti di rabbia dopo 6 giorni.

B) Infettando i ratti di virus fisso sotto cute e praticando subito 5 iniezioni di una soluzione di una data sostanza, una nel punto di innesto e quattro attorno al medesimo, risultò quanto segue:

1° Si salvarono 1 su 2 dei ratti trattati con ammoniaca 1 : 250; 2 su 3 dei ratti trattati con permanganato potassico 1 : 200; si salvarono tutti gli animali trattati con nitrato d'argento 1 : 1000, tachiolo 1 : 5000, ittargano 1 : 1000, collargolo 1 : 1000, protargolo 1 : 200, sublimato 1 : 10000, acido fenico 2 : 100.

Si salvarono pure 1 su 2 dei ratti trattati con acqua ossigenata pura; 1 su 1 dei trattati con bleu di metilene 1 : 200; 1 su 2 dei trattati con larycith.

2° Il periodo di incubazione nei casi in cui si ebbe lo sviluppo della rabbia non venne prolungato.

C) I ratti infettati di virus fisso sotto cute e trattati come sopra, ma dopo 15′, 30′, 60′, con iniezioni di tachiolo 1 : 5000; acido

fenico 3 %; bleu di metilene 1 : 200; argento colloidale 1 : 1000; protargolo 1 ; 100 e permanganato potassico 1 : 200, morirono tutti in numero di 36 contemporaneamente ai 5 controlli in 6-7 giorni, senza quindi presentare alcun prolungamento del periodo d'incubazione.

D) I ratti infettati di virus fisso sotto cute e trattati con soluzione di acido fenico 3 %, bleu di metilene 1 %, larycith 1 %, argento colloidale 2 % coll'aggiunta di sostanza nervosa normale al 10 %, morirono tutti di rabbia in numero di 16 insieme ai 4 controlli.

Concludendo, quindi, si possono salvare i ratti sicuramente anche infettati mediante iniezioni sottocutanee di virus fisso, purchè il trattamento locale sussegua subito all'infezione.

XVI.

Immunizzazione contro la rabbia.

A. — *Critica dei principali lavori pubblicati sull'argomento.*

La quistione dell'immunizzazione dei comuni animali d'esperimento (cani, conigli, ecc.) contro le inoculazioni subdurali, intraoculari, intratracheali e sottocutanee tanto di virus fisso che di virus di strada, dato l'esiguo numero degli animali sui quali si è sperimentato e data l'incertezza dei risultati ottenuti, non si può considerare come risolta in modo indiscutibile.

Basta infatti passare in rivista i risultati seguenti delle ricerche più importanti istituite su quest'argomento per convincercene completamente.

1° *Riguardo all'immunizzazione contro l'infezione subdurale di virus di strada*:

Pasteur ottenne risultato completamente positivo salvando i 5 cani sui quali esperimentò, mentre i 5 di controllo morirono tutti.

Questa esperienza, come si vede, sarebbe di sommo valore se, ripetuta da altri, non avesse dati risultati contraddittori e se il numero degli animali non fosse stato così scarso in una ricerca di così capitale importanza.

Frisch, contrariamente agli splendidi risultati ottenuti dal Pasteur, sarebbe riuscito a salvare soltanto 2 dei 37 animali da lui infettati, cioè il 5. 4 %.

Come si vede, si può dire che il risultato fu quasi totalmente negativo, se si tien conto che su 15 animali infettati dall'Högyes e non vaccinati se ne salvarono 6 cioè il 40 %.

Högyes avrebbe ottenuti risultati alquanto migliori salvando 12 dei 45 animali esperimentati, cioè il 26 %.

Per altro, però, mentre il Pasteur esperimentando soltanto su 5 cani ottenne risultato completamente positivo salvandoli tutti, Högyes esperimentando su un numero di animali 10 volte maggiore ottenne risultato positivo solo nel 26 %; negativo quindi nientemeno che nel 74 %. Inoltre se si tien conto che su 45 animali vaccinati l'Högyes ne contrappose soltanto 6 di controllo e se ricordiamo ancora che dei 15 animali infettati da Högyes senza venire immunizzati se ne salvarono 6, cioè il 40 %, i dubbi che si potessero sollevare sui risultati ottenuti dal Pasteur coi suoi 5 cani sembrano giustificati osservando i risultati quasi totalmente negativi ottenuti dall' Högyes.

Io quindi concludo che l'immunizzazione contro l'infezione di virus di strada sotto dura non si è ancora ottenuta.

2° Riguardo all'immunizzazione contro l'infezione subdurale di virus di passaggio le ricerche sono molto scarse. Ad ogni modo si può vedere che il Frisch avrebbe ottenuto risultato completamente negativo su 3 cani, l'Högyes ne avrebbe salvati 2 : 6, cioè il 33 %. Siccome, per altro, come si disse già, Högyes ottenne in altre esperienze il 40 % di risultati negativi negli animali di controllo ed in questa ricerca trascurò completamente di istituire le esperienze di controllo, così si può concludere non essere dimostrata la possibilità di immunizzare gli animali infettati sotto dura di virus di passaggio.

3° Riguardo all'immunizzazione contro l'infezione subdurale di virus fisso, dai risultati delle esperienze concordi del Frisch, che non riuscì a salvare nessuno dei 6 animali infettati dal virus sotto dura e poi vaccinati; dell'Högyes che ottenne pure risultato completamente negativo nei suoi 8 animali e così del De Renzi e di Celli e De Blasi, e di Kraus, Keller e Clairmont, si può concludere che non si è riusciti ancora a salvare certamente gli animali infettati di virus fisso sotto dura mediante l'immunizzazione attiva.

4° Anche riguardo all'infezione intraoculare di virus di strada non è ancora data la sicura dimostrazione che si possano salvare gli animali. Högyes infatti avrebbe salvato soltanto 2 animali su 11, cioè il 17 %.

5° Molto più importante per noi delle immunizzazioni contro l'infezione subdurale, intraoculare od endovenosa, che hanno dato risultati negativi o molto dubbi è l'immunizzazione contro l'infezione sottocutanea, sia ottenuta per morso di animali idrofobi che direttamente per iniezione.

Riguardo all'immunizzazione contro l'infezione sottocutanea di virus di strada ottenuta per morso di animali idrofobi, il Pasteur salvò 8 cani su 10, cioè l'80 % degli animali infettati. Per altro anche dei controlli si salvò il 55 %. Ora se si tien calcolo dell'esiguo numero di animali (1) dal Pasteur immunizzati, e della forte percentuale di controlli che si salvano, non sarebbero completamente ingiustificati i dubbi che si volessero sollevare su questi risultati.

Il Frisch, infine, esperimentando su conigli e cani inoculati direttamente sotto cute di virus di strada, avrebbe ottenuto risultato positivo in 8 animali su 18, cioè nel 44 %. Ma ad annullare completamente questo risultato positivo viene il fatto che il 44 % degli animali di controllo non contrasse la rabbia.

(1) Si tratti pure di 20 cani, come il Pasteur avrebbe comunicato al Frisch in una lettera dell'8 maggio 1886.

Contemporaneamente alla mia prima nota preventiva pubblicata sulla *Riforma medica*, usciva un lavoro di Schnürer (1) nel quale l'A. tratta 25 cani col suo vaccino mediante iniezioni sottocutanee.

Di questi 25 cani 3 vengono infettati nei muscoli e 2 mediante morso di cane idrofobo; vie queste entrambe mal sicure, specialmente mancando gli animali di controllo.

Di 8 cani infettati sotto dura di virus fisso ne muoiono 6 di rabbia; di altri 6 cani pure infettati sotto dura, ma di virus di strada, uno muore 5 sopravvivono.

Quindi le conclusioni che si vogliono trarre da questo lavoro si devono basare soltanto sopra i 6 cani inoculati sotto dura di virus di strada.

Quantunque il numero di questi animali salvati (5-6) sia piccolo e l'A. abbia scelto pei controlli degli animali di altra specie, cioè dei conigli invece che dei cani ed anche in scarso numero (uno per volta), tuttavia questi risultati confermati che vengano, saranno di sommo valore.

Dopo la mia suddetta nota invece è uscito un lavoro di Heller sull'immunizzazione contro la rabbia (2).

Questo lavoro (3) consiste nella preparazione di un vaccino mediante un nuovo metodo e in esperienze d'immunizzazione col medesimo.

L'A. prepara il suo vaccino spappolando, coll'apparecchio di Macfadyen's il materiale rabido congelato coll'aria liquida.

Il materiale così preparato non è più infettivo.

L'A. inocula sotto cute a conigli da 15 a 18 cmc. circa del suo vaccino mediante 6-10 iniezioni e poscia infetta l'animale sotto cute (!) con virus di strada o con virus di passaggio.

Disgraziatamente dalle esperienze istituite dall'A. non se ne può trarre alcuna conclusione, perchè una epidemia gli uccise la maggior parte degli animali in esperimento, sicchè tutto il lavoro d'immunizzazione si concentra su 8 conigli e perchè gli animali furono infettati sotto cute, cioè per una via che nella maggioranza dei casi non uccide di rabbia.

L'A. iniettò bensì 4 animali per controllo, ma invece che inocularli sotto cute, come doveva, li inoculò sotto dura.

Ora se si riflette alla forte percentuale di risultati negativi che si ottennero nei controlli (Frisch 44 %, Högyes 40 %, Kraïouschkine 53 %, Remlinger persino 87 %) e viceversa l'esiguo numero di animali sui quali si esperimentò, i risultati positivi ottenuti nella vaccinazione contro l'infezione sottocutanea di virus di strada rimangono di dubbio valore e la dimostrazione decisiva sulla possibilità di ottenere l'immunizzazione contro l'infezione sottocutanea di virus di strada attende ancora ulteriori esperienze e conferme.

---

(1) SCHNÜRER I. *Ueber die Schutzimpfung der Hunde gegen Tollwut.* 1 Mitt. Zeitschr. f. Hyg. Bd. 51, Heft, 1, 1905.

(2) Si vede che la mia nota preventiva, che riassume anche numerose serie di esperienze istituite sull'immunizzazione verso la rabbia, non è venuta a conoscenza dell'A. perchè non ne fa affatto menzione nè nel lavoro, nè nella bibliografia.

(3) O. HELLER. *Die Schutzimpfung gegen Lyssa.* Jena, Gustav Fischer, 1906.

B. — *Ricerche sperimentali sull'immunizzazione contro la rabbia.*

Considerando quindi il piccolissimo numero di animali adoperati dai vari autori e osservando la fortissima percentuale degli animali di controllo che, infettati e non vaccinati non presero la rabbia, ho ritenuto non superfluo ritornare con numerose esperienze su una questione di così capitale importanza.

Queste ricerche mi furono poi in modo speciale facilitate dall'aver io trovato nei muridi degli animali dotati di una speciale sensibilità all'infezione sottocutanea di rabbia.

Le esperienze in discorso, che richiesero qualche anno di lavoro ed oltre 352 animali (14 cani e 338 muridi), vennero istituite secondo il seguente prospetto:

a) Immunizzazione preventiva alla Pasteur e susseguente infezione sotto dura di virus fisso.

b) Immunizzazione mediante virus fisso attenuato e susseguente infezione sottocutanea di virus fisso fresco.

c) Infezione preventiva sottocutanea di virus fisso e susseguente immunizzazione mediante iniezioni sottocutanee di emulsione di virus fisso attenuato alla Pasteur.

d) Infezione di virus di strada sotto cute e susseguente immunizzazione mediante iniezioni ipodermiche di virus fisso attenuato alla Pasteur.

e) Immunizzazione preventiva mediante iniezioni ipodermiche di emulsione di virus fisso attenuato alla Pasteur e susseguente infezione sottocutanea di virus di strada.

f) Metodi di vaccinazione contro la rabbia applicati all'uomo e loro inconvenienti.

g) Nuovi metodi di vaccinazione.

h) Infezione di virus di strada sotto cute e susseguente immunizzazione mediante iniezioni sottocutanee di emulsione di virus fisso al 10 % coll'aggiunta di sublimato, ermofenile, argento colloidale, protargolo, actolo, bleu di metilene, larycith e timolo.

i) Infezione sotto cute di virus di strada e susseguente immunizzazione con emulsione di virus fisso coll'aggiunta di timolo principiata dopo alcun tempo dall'infezione.

k) Infezione subdurale di virus di strada e susseguente immunizzazione con emulsione di virus fisso al 10 % coll'aggiunta di acido fenico all'1 %.

l) Infezione preventiva di virus di strada sotto cute e susse-

guente immunizzazione mediante emulsioni di virus fisso fresco conservato con acido fenico 1 %.

m) Immunizzazione dei muridi per ingestione di materiale rabido contro la susseguente infezione sottocutanea di virus di strada.

a. — *Immunizzazione preventiva alla Pasteur e susseguente infezione sotto dura di virus fisso.*

Frisch, Högyes, De Renzi, Celli e De Blasi, ecc., dimostrarono non essere possibile salvare cani inoculati sotto dura di virus fisso o di virus di strada sottoponendoli alla cura Pasteur, sia col trattamento semplice che col trattamento intensivo. Ora io iniziai le mie esperienze sull'immunizzazione verso la rabbia istituendo alcune ricerche in proposito delle quali riporto, per brevità, soltanto la

Conclusione. — D'accordo colle esperienze di Frisch, Högyes, De Renzi, ecc., mediante il trattamento alla Pasteur, sia semplice che intensivo, non mi fu possibile immunizzare cani e muridi (in tutto 20 animali) infettati sotto dura di virus fisso e di virus di strada, sia prima che dopo il trattamento stesso e neppure di ottenere un ritardo nel periodo d'incubazione.

b. — *Immunizzazione mediante virus fisso attenuato e susseguente infezione sottocutanea di virus fisso fresco.*

Pasteur, Högyes e altri autori sono riusciti a salvare dalla rabbia mediante il trattamento Pasteur, soltanto i cani infettati per via ipodermica, sia per iniezione che per morso.

Non essendo, da un lato, costante l'infezione rabbica sperimentale sottocutanea nei cani e disponendo io dall'altro canto, di animali oltremodo adatti per queste esperienze, ritenni non inutile il riprendere lo studio di questa quistione.

A tal uopo istituii alcune esperienze delle quali riporto qui i

Risultati. — Nella immunizzazione con virus fisso attenuato contro una susseguente infezione sottocutanea di virus fisso si ebbe:

1° Iniettando da 10 sino a 64 cmc. di vaccino gli animali, in numero di 36, morirono tutti.

2° Iniettando da 80 a 96 cmc. di vaccino gli animali, in numero di 19 sopravvissero tutti, cioè il 100 % riuscendo così, per la prima volta, a vaccinare gli animali contro una susseguente infezione sottocutanea di virus fisso.

c. — *Infezione preventiva sottocutanea di virus fisso e susseguente immunizzazione mediante iniezioni sottocutanee di emulsione di virus fisso attenuato alla Pasteur.*

Delle esperienze istituite in proposito eccone i

Risultati:

1° Dei ratti bianchi, in numero di 12, iniettati con 12 sino a 42 cmc. di vaccino contrassero tutti la rabbia. In questi ultimi con 42 cmc. si ebbe però un ritardo di 6 giorni. Anche 6 topolini vaccinati con 3 ½ cmc. morirono in 7 giorni di rabbia.

2° Vaccinando invece i ratti con 54-90 cmc. questi si salvarono tutti, cioè il 100 %.

3° Con ciò si è ottenuto per la prima volla l'immunizzazione anche contro l'infezione preventiva di virus fisso.

d. — *Infezione di virus di strada sotto cute e susseguente immunizzazione mediante iniezioni ipodermiche di virus fisso attenuato alla Pasteur.*

Dalle esperienze istituite a tal uopo ottenni i seguenti

Risultati:

1° Gli animali, in numero di 16, iniettati con 20 sino a 45 cmc. di vaccino morirono tutti di rabbia. Si salvarono soltanto 4 ratti neri vaccinati con 30 cmc. di virus fisso di 3ª e 4ª giornata.

2° Vaccinando invece gli animali con 60-80 cmc. di vaccino, questi, in numero di 16, sopravvissero tutti, cioè il 100 %.

e. — *Immunizzazione preventiva mediante iniezioni ipodermiche di emulsione di virus fisso attenuato alla Pasteur e susseguente infezione sottocutanea di virus di strada.*

Dalle esperienze istituite ottenni quanto segue:

1° Iniettando 40 cmc. di vaccino Pasteur gli animali morirono tutti di rabbia.

2° Iniettandone invece 60 cmc. gli animali si salvarono tutti.

f. — *Metodi di vaccinazione contro la rabbia applicati all'uomo e loro inconvenienti.*

I metodi di vaccinazione antirabica sin qui provati sull'uomo sono: il metodo Pasteur, il metodo Ferran, il metodo Högyes ed il metodo Puscariu, i quali quantunque differenti hanno dato risultati presso a poco uguali.

α. *Metodo Pasteur.* — Gli inconvenienti del metodo Pasteur sono:

1° Le ingenti spese sostenute da privati e da comuni.

2° I disagi che devono spesso sopportare i morsicati per recarsi in lontani istituti antirabici.

3° I pericolosi ritardi nell'intraprendere la cura.

4° L'incerta asepsi del vaccino e quindi la possibilità di produrre ascessi e setticemie mortali (1).

5° L'irregolare e non sicura attenuazione del vaccino e quindi la possibilità, quantunque dubbia, di trasmettere mediante il vaccino stesso la rabbia paralitica all'uomo.

6° La lentezza nella produzione degli anticorpi (2) e quindi la eccessiva durata della vaccinazione.

7° Una volta che, come abbiamo visto, ogni tentativo di vaccinazione mediante iniezioni ipodermiche di emulsione di virus fisso contro l'infezione sottocutanea di virus fisso, tentate da altri e da me, si può dire fallito, io ritengo completamente inutile quella modalità del metodo Pasteur consistente nella vaccinazione con la serie graduale di midolli attenuati. Se infatti è dimostrato sperimentalmente che le iniezioni sistematiche preventive di emulsioni di virus fisso attenuato, non riescono a salvare gli animali infettati sotto cute di virus fisso, tanto meno si dovrà sperare che le poche iniezioni di emulsione di midollo dal 12 al 2 abbiano a salvare contro l'eventuale infezione dei susseguenti midolli 2-1.

Detta modalità serve, secondo me, soltanto a complicare il metodo, e sarebbe quindi da abbandonarsi.

Si raggiungerebbe lo stesso scopo, e più semplicemente, vaccinando soltanto col midollo di sesta o quinta giornata, oppure con virus fisso attenuato con sostanze chimiche, come si vedrà in seguito.

Il fatto che pur arrivando ad iniettare anche il numero 2 e persino il numero 1 non si uccide di rabbia paralitica, dipende esclusivamente dalla refrattarietà dell'uomo a questo virus per via sottocutanea.

---

(1) Oltre i vari accidenti capitati in alcuni Istituti antirabici italiani, ricorderò quello di Palmiski (Gaz. médic. de Botkine n. 5-1902) all'Istituto Pasteur di Varsavia: Su 40 vaccinati si ebbe una eruzione scarlattiniforme in 22 per cui si dovette chiudere temporaneamente l'Istituto, disinfettarlo e far venire altro virus. Un caso simile accadde a Nicolas (Soc. méd. des hôpiteaux, 17 gennaio 1905).

(2) La maggior quantità di sostanze lissicide nel siero di conigli immunizzati si avrebbe 20 giorni dopo l'ultima iniezione (Tizzoni e Centanni) e nell'uomo dopo 21-22 giorni (Kraus e Kreissl Centr. f. Bakt. Orig. XXXII pag. 810, 1902).

Lo sperare mediante il vaccino più attenuato di proteggere l'uomo contro le susseguenti iniezioni di emulsione di 2 o 1 giorno, ritengo, non soltanto errato, ma anche pericoloso, perchè un individuo recettivo al virus fisso inoculato sotto cute col numero 2 e numero 1, morirebbe senz'altro di rabbia paralitica, come avviene dei muridi, e qualche volta dei conigli, delle cavie e dei cani.

β. — *Metodo Ferran.* — 10 grammi di cervello di coniglio rabico vengono emulsionati in 30 cmc. di acqua sterilizzata: di questa emulsione se ne iniettano 40 cmc. in 10 giorni praticando 4 iniezioni al giorno.

Questo metodo ha il vantaggio di eliminare l'inutile serie dei midolli attenuati alla Pasteur, ma conserva viceversa tutti gli altri inconvenienti ascritti al metodo francese, e per di più presenta un maggior pericolo (almeno teoricamente) di trasmettere la rabbia mediante lo stesso vaccino. Ricordo all'uopo i dolorosi accidenti capitati al Bareggi. I risultati pratici di questo metodo sono press'a poco come quelli ottenuti in molti Istituti antirabbici, cioè una mortalità del 0.2 %, calcolata su 1000 vaccinati.

γ. — *Metodo di Högyes.* — La cura, secondo questo metodo, viene iniziata mediante l'iniezione di una diluizione di virus fisso all' 1 : 10,000 e continuata con iniezioni di emulsioni gradualmente meno diluite fino ad arrivare all' 1 %. L'attenuazione quindi secondo il metodo di Högyes viene ottenuta colla diluizione invece che col disseccamento.

Questo metodo ha tutti gli inconvenienti del metodo Pasteur senza alcun vantaggio. Il pericolo poi della trasmissione della rabbia mediante il vaccino si ha presso a poco come col metodo Ferran, sia perchè le emulsioni, non solo all' 1 : 10,000, ma anche all' 1 : 40,000-50,000, come ho potuto dimostrare, sono ancora virulente e sia perchè le iniezioni di un vaccino debole non riescono, come già dicemmo, ad immunizzare contro il virus fisso.

Questo metodo quindi è teoricamente pericoloso quale quello del metodo Ferran ed inutilmente più complicato.

δ. — *Metodo Puscariu.* — Puscariu vaccina mediante iniezioni continuate per 25 o 30 giorni, di un'emulsione preparata con un cervello di coniglio morto di virus fisso spappolato in 100 cmc. di soluzione fisiologica, sterilizzata mediante il riscaldamento ad 80° per 15'.

Questo metodo ha il vantaggio di esporre meno facilmente i morsicati al pericolo di una infezione da virus fisso e di aver eliminato la complicata quanto inutile modalità della serie dei midolli attenuati, ma presenta tutti i restanti inconvenienti, compreso quello dell'incostanza del metodo di attenuazione.

Il risultato ottenuto con questo metodo è presso a poco uguale a quello che si ha in molti Istituti Pasteur, cioè una mortalità del 0.27 %. Tale metodo è stato lodato da Oshida (a Tokìo), ma criticato da Onchakow e da Novi.

Nuovi metodi di vaccinazione.

Si eliminerebbero naturalmente questi inconvenienti cambiando il metodo di attenuazione e preparazione del vaccino, e, se, come avviene per altri vaccini e pei sieri, anche il vaccino antirabico potesse trovarsi ovunque, sì che ogni medico in ogni luogo potesse praticare la vaccinazione antirabica.

Per un vaccino conservabile e commerciabile si comprende benissimo che non può servire il vaccino attenuato col metodo Pasteur, nè col metodo Högyes, nè col metodo Puscariu.

Un vaccino adatto, invece, dovrebbe prepararsi coll'encefalo e col midollo spinale di animali, possibilmente di grossa mole (pecore, cavalli, cani, ecc.), attenuato nello stesso tempo coll'aggiunta di adatti antisettici tollerabili per via ipodermica.

Queste considerazioni mi spinsero ad intraprendere in proposito alcune esperienze preliminari.

In una prima serie di ricerche cercai tra numerose sostanze chimiche quali di queste mantenessero sterile l'emulsione alla temperatura di 30°.

A questo scopo distribuii in provette 5 cmc. delle varie sostanze sperimentate; aggiunsi in ciascuna provetta mezzo grammo di virus fisso fresco spappolato, e posi le provette a 30° C. per 6 giorni. Dopo questo tempo esaminai per mezzo di lastre in agar, quali provette erano sterili e quali no.

In altre serie di simili ricerche determinai la dose minima delle varie sostanze capaci di arrestare completamente lo sviluppo di germi a 22-30° di 5 cmc. di emulsione di cervello al 20 %.

Riporterò altrove le varie tabelle relative ai risultati ottenuti. Per ora mi limito di notificare che delle 17 sostanze provate, l'acido fenico fu quello che si mostrò più adatto allo scopo.

Dopo queste prime ricerche di orientamento, veniamo senz'altro ai risultati delle varie esperienze istituite con vari vaccini.

Infezione di virus di strada sotto cute e susseguente immunizzazione mediante iniezioni sottocutanee di emulsioni di virus fisso al 10 % coll'aggiunta di sostanze chimiche (1).

Tra le sostanze che insieme ad una azione antisettica potessero anche esercitare un'azione attenuante sul virus fisso fresco e trasformarlo in vaccino, provai alcuni composti di mercurio, di argento e di iodio insieme a vari altri antisettici. Se provai talora sostanze troppo energiche e concentrazioni troppo forti, lo feci mosso da qualche altro obbiettivo del quale dirò.

Ecco i risultati delle varie esperienze:

1° Iniettando 60 cmc. di vaccino coll'aggiunta di sublimato, si salvò metà degli animali.

2° Iniettando 30 cmc. di vaccino coll'aggiunta di ermofenile, gli animali si salvarono pure in ragione della metà.

3° Iniettando 60 cmc. di vaccino coll'aggiunta di argento colloidale 1 %, gli animali si salvarono.

4° Iniettando 60 cmc. di vaccino coll'aggiunta di protargolo, gli animali si salvarono.

5° Iniettando sia 60 che 24 cmc. di vaccino coll'aggiunta di actolo 1 : 500 gli animali si salvarono tutti.

6. Iniettando dei ratti con 30 cmc. di vaccino coll'aggiunta di larycith questi morirono; mentre altri ratti iniettati pure con 30 cmc., ma coll'aggiunta di bleu di metilene, si salvarono.

7° Iniettando sia 9 che 15 cmc. di vaccino coll'aggiunta di timolo 1/2 % gli animali contrassero tutti la rabbia; iniettando invece 24 cmc. gli animali si salvarono tutti.

8° Tutti i ratti di controllo, in numero di 12 infettati sotto cute di virus di strada morirono di rabbia in 13-15 giorni.

Infezione sotto cute di virus di strada e susseguente immunizzazione mediante iniezioni di virus fisso coll'aggiunta di sostanze principiata dopo alcun tempo.

Dalle esperienze istituite a questo riguardo risulterebbe:

1. Che bastarono 30 e persino 24 cmc. di vaccino coll'aggiunta di timolo 1/2 %, iniettato dopo 5 giorni per immunizzare gli animali inoculati preventivamente sotto cute con virus di strada.

2. Che gli animali di controllo morirono tutti di rabbia in 13 giorni.

---

(1) Riguardo alla dose minima lissicida di numerose sostanze vedi mio lavoro recente: *L'azione di vari agenti chimici sul virus rabico*. Scansano, tip. ed. degli Olmi, 1906.

Infezione subdurale di virus di strada e susseguente immunizzazione con emulsione di virus fisso al 10 % coll'aggiunta di acido fenico all'1 %.

Dalle esperienze istituite in proposito su 34 animali, risultò:

1. Che inoculando gli animali sotto dura e poi vaccinandoli con 20 sino a 30 cmc., questi si salvarono soltanto in numero di 9 : 23, cioè del 39 %.

2. Gli animali di controllo morirono tutti di rabbia in 12-14 giorni.

Si può quindi concludere che è oltremodo difficile immunizzare degli animali inoculati di virus di strada sotto dura.

Infezione preventiva di virus di strada sotto cute e susseguente immunizzazione mediante emulsione di virus fisso fresco contenente acido fenico 1 %.

Dalle 30 esperienze istituite, nelle quali si sacrificarono 135 animali, risultò:

1. Che iniettando da 10 a 18 cmc. di vaccino, costituito da emulsione di virus fisso al 10 % e acido fenico 1 %, contro l'infezione sottocutanea di virus di strada i ratti si salvarono nella proporzione del 33 %.

2. Iniettando gli animali con 20-24cm c. di detto vaccino, questi si salvarono nella proporzione pure del 33 %.

3. Iniettando gli animali con 28 cmc. di vaccino, questi in numero di 50 si salvarono tutti, cioè nella proporzione del 100 %.

Nella stessa proporzione si salvarono pure altri ratti trattati nello stesso modo, ma con emulsione all' 1 : 1000.

4. Di 13 topolini iniettati con 5 cmc. di vaccino, 3 soltanto si salvarono, cioè il 23 %, mentre altri 4 topolini iniettati con 10 cmc. si salvarono tutti.

Quindi per i topolini una vaccinazione efficace si ottiene solo con 10 cmc. di vaccino.

5. Trentaquattro animali di controllo morirono tutti di rabbia.

6. I ratti bianchi infettati di virus di strada e trattati poi solo con una soluzione di acido fenico al 2 %, come controprova, morirono nella proporzione dell'80 %.

7. Di tutti i metodi d'immunizzazione contro l'infezione sottocutanea di virus di strada ha dato migliori risultati quello rappresentato dal vaccino costituito da virus fresco al 10 % ed anche molto

più diluito, coll'aggiunta di acido fenico 1 % iniettata nella proporzione di 30 cmc. in 10-20 giorni, mediante 15-30 iniezioni.

8. Dalle presenti e passate esperienze risulta inoltre: *a*) che in armonia con ciò che si è constatato in vari istituti antirabici, l'efficacia della vaccinazione dipende più dal numero delle iniezioni e dal tempo impiegato che dalla quantità del vaccino iniettato; *b*) che contro Gamaleia, Krasmitski, ecc., e d'accordo con Pasteur, Puscariu, ecc., l'emulsione rabica privata della sua virulenza mediante antisettici (meglio che col disseccamento) costituisce un vaccino, l'efficacia del quale non è per nulla inferiore a quella del vaccino virulento.

Le iniezioni quotidiane di 3 cmc., una alla mattina ed una alla sera, di emulsione al 5 % (1) di encefalo di coniglio morto di virus fisso e sterilizzata con acido fenico all' 1 % viene tollerata benissimo dall'uomo. Anzi l'azione anestetica dell'acido fenico rende le iniezioni quasi indolore in modo da non aversi più bisogno della aggiunta di cocaina, come facevasi per l' innanzi.

Quanto tempo può durare l'azione immunizzante di questo vaccino?

Siccome era sommamente importante il decidere se il vaccino conservasse la sua azione per parecchio tempo o se invece era assolutamente indispensabile immunizzare con vaccino preparato di fresco, istituii alcune esperienze con vaccino preparato da tre e da quattro mesi.

Conclusione generale.

Risultato. — Da queste esperienze risultò che l'azione del vaccino era ancora attiva dopo 4 mesi.

Io ritengo il sopra esposto metodo d'immunizzazione attiva contro la rabbia superiore a tutti gli altri sin qui escogitati e conosciuti e ciò per le seguenti ragioni:

1. La superiorità dell'efficacia di questo metodo è stata dimostrata chiaramente su un forte numero di animali. Difatti il 100 % degli animali infettati di virus di strada sotto cute e trattati con

(1) Il vaccino Pasteur preparato con un cm. di midollo del peso di gr. 0.1-0.15 emulsionato in 3 cmc. di acqua corrisponde ad una emulsione del 3.5-4.5 % circa.

L'emulsione al 10 % invece viene tollerata bene al momento, ma dopo un'ora circa l'individuo avverte spesso nella parte un indolenzimento che dura varie ore.

28-30 cmc. di vaccino all'acido fenico vennero salvati, mentre tutti gli animali di controllo, cioè il 100 %, morirono di rabbia.

2. Il vaccino, preparato secondo il mio metodo, si può conservare e spedire, come si fa pei sieri e per gli altri vaccini, sì da poterlo trovar pronto in ogni luogo ed a disposizione di ogni ufficiale sanitario, potendosi così intraprendere la cura sul posto e subito dopo avvenuto il morso.

3. Le ingenti spese a carico dei comuni e delle provincie per l'impianto e mantenimento di Istituti antirabici potrebbero venire alquanto diminuite.

4. Oltre alle minori spese da parte dei privati, si sarebbero eliminati i disagi dei lunghi viaggi e le protratte permanenze nel luogo di cura.

5. Trovandosi il vaccino in ogni luogo, non accadrebbe più che un gran numero di morsicati si presenti all'Istituto dopo 5-10 ed anche 15 giorni dal momento che è avvenuto il morso, compromettendo grandemente l'efficacia della cura, e molto minore sarebbe la percentuale degli individui che, per ignoranza o per altre cause trascurerebbero di sottoporsi alla vaccinazione.

6. Un altro vantaggio non trascurabile di questo metodo è che tutto il lavorìo quotidiano per la estrazione del midollo dai conigli rabidi per l'inoculazione del coniglio, per la manutenzione, in una parola, della serie dei midolli e la preparazione del vaccino, sarebbe eliminato.

7. Un ultimo ed importante pregio del suddetto metodo si è che le probabilità di dolorosi accidenti quali gli ascessi, setticemie talora mortali prodotti dal vaccino, della sepsi del quale non si può mai esser sicuri, verrebbero grandemente diminuite.

Ora quasi tutti questi vantaggi mancano, ripeto, al metodo di Pasteur, di Ferran, di Högyes e di Puscariu.

XVII.

Immunizzazione dei muridi per ingestione di materiale rabido contro la susseguente infezione sottocutanea di virus di strada.

Non era senza interesse il decidere se fosse possibile immunizzare i muridi contro l'infezione sottocutanea di virus di strada e di virus fisso mediante l'ingestione prolungata di virus fisso od anche di virus di strada.

Da mie ricerche istituite per la prima volta in proposito risultò che l'ingestione di materiale rabido eserciterebbe in modo assoluto una spiccata azione immunizzante contro l'infezione sottocutanea di virus di strada. Difatti di 81 muridi così vaccinati per 30-26-20 ed anche solo 10 giorni e poi infettati di virus di strada se ne salvò l'89 %, e precisamente il 100 % dei vaccinati *ab ingesti* per 30 giorni, il 90 % dei vaccinati per 20-26 giorni, il 31 % dei vaccinati per 10 giorni; invece gli animali vaccinati per soli 5 giorni, in numero di 5 e quelli di controllo, in numero di 22, morirono tutti di rabbia.

La vaccinazione *ab ingesti* può immunizzare anche contro l'infezione sottocutanea di virus fisso, purchè venga protratta per almeno 30 giorni.

Molti casi negativi ottenuti nei tentativi di trasmissione della rabbia per questa via dipendono forse, ripeto, dall'immunizzazione dell'animale.

XVIII.

Se il virus rabido produce nessun enzima nel sistema nervoso.

Non era senza interesse per la conoscenza della natura e della biologia del virus rabido il ricercare se il medesimo producesse nell'animale nessuna traccia di enzimi.

Gli enzimi da me ricercati furono il proteolitico, l'amilolitico, l'inversivo e quello che decompone l'amigdalina.

Rimandando il lettore al lavoro completo mi limito a comunicare che tutte queste ricerche diedero risultato totalmente e costantemente negativo. A me non riuscì, come del resto prevedevo, di dimostrare tracce dei suddetti enzimi nel sistema nervoso di animali rabidi.

XIX.

Sulla propagazione della rabbia per mezzo dei ratti e dei sorci.

Gli ultimi lavori sulla rabbia nei muridi hanno fatto nascere il dubbio e sollevare l'ipotesi che questi animali possano essere dei temibili propagatori della rabbia.

Io non sono di questa opinione. Vi sono è vero dei fatti che parlerebbero in favore di questa ipotesi, ma qualcuno è per se insostenibile e gli altri vengono distrutti da altri fatti e da altre considerazioni.

Parlerebbero a favore dell'opinione in discorso i fatti seguenti:

1° Che i muridi, come ho dimostrato io, possono contrarre la rabbia ingerendo materiale rabico.

2° Che il virus rabico mentre si attenua passando da cane a cane, si esalta invece passando da ratto a ratto e più rapidamente che nel gatto e nel coniglio.

3° Che si conoscono alcuni casi di persone morsicate da ratti e da sorci sospetti, così quelli riferiti da De Blasi e Russo Travali (1), Marino Zuco (2), Zaccaria (3), Nicolle e Chaltiel (4) e da Remlinger (5), nonchè un caso di morsicatura in un coniglio riferito da Kraïouschkine (6).

Per altro non è stato dimostrato che i muridi morsicatori fossero realmente idrofobi: anche riguardo al caso raccontato da Remlinger, non è stato provato che la giovane di Smirne morsicata da un sorcio 6 mesi prima non abbia contratto l'infezione in altro modo. Dopo tutto è un medico di Smirne che riferisce il caso, ed anch'egli si basa sul racconto della ragazza. Di più, cosa non frequente, la malattia sarebbe durata 9 giorni!

Parlano poi invece contro alla propagazione della rabbia per mezzo dei muridi i fatti e le considerazioni seguenti:

1° Io ho dimostrato, è vero, che i muridi possono contrarre la rabbia ingerendo materiale rabico, ma ho dimostrato altresì essere oltremodo difficile trasmettere la rabbia da ratto a ratto e da sorcio a sorcio per mezzo della saliva inoculata sotto cute tanto per iniezione che per morso. Infatti la saliva e le glandole salivari di 20 ratti morti di rabbia da virus di strada, venne da me provata su 71 topolini, sempre con risultato negativo. Due ratti ed un topolino fatti da me mordere da un ratto affetto da rabbia furiosa sperimentale vivono tuttora.

Se anche Nicolle e Chaltiel e Galli Valerio trovarono qualche volta la saliva dei ratti virulenta non bisogna dimenticare che i predetti autori provarono la virulenza della saliva inoculandola per via subdurale e corneale e non per la via ipodermica, cioè per lo più naturale come ho fatto io. Si tenga presente poi che i muridi sono sensibili alle inoculazioni cutanee di virus rabico anche nella diluizione da 1:50,000.

(1) De Blasi e Russo Travali. Baumg. Jahresb. 1890, p. 152.
(2) Marino Zuco. Ann. di Igiene sperim. 1903.
(3) Zaccaria. Rend. Statist. delle vaccin. Antir. dell'Istituto di Faenza 1903.
(4) Nicolle e Chaltiel. Ann. d. l'Instit. Pasteur. 1904.
(5) Remlinger. Soc. de Biol. gennaio 1904 e 1° luglio 1905.
(6) Kraïouschkine. Baumg. Jahresb. 1893, p. 115.

Non è improbabile che ratti sani, ma imbrattati di materiale rabico per aver divorata una carogna di un animale morto di idrofobia possano contagiarsi tra loro e trasmettere indirettamente anche la rabbia ad altri animali.

Infatti i ratti divorano facilmente, come si sa, le carogne degli animali; per es. i ratti del mio allevamento sono stati capaci, in sole 24 ore di divorare sino alle ossa dei grossi cani posti loro per nutrimento.

Riferisce il Brehm che in uno scorticatoio presso Parigi i ratti divorarono in una notte i cadaveri di 35 cavalli!

Tutto ciò per altro è molto più difficile per i topolini che meno facilmente divorano le carogne dei cani, dei gatti, dei lupi e delle volpi.

2° Se è vero che il virus di strada si esalta rapidamente nel ratto, è altresì vero che questo esaltamento non può avvenire facilmente in natura essendo nei ratti rara tanto la rabbia furiosa quanto dubbia l'infettività del morso.

Sappiamo poi d'altra parte che quando il virus di strada si è trasformato in virus fisso è ancor meno trasmissibile per questa via.

3° In natura la rabbia nel ratto e nel sorcio dev'essere oltremodo rara, sia perchè come si disse, non se ne conosce che qualche caso molto incerto e sia perchè, quantunque questi animali conducano vita in comune e possano morsicarsi liberamente e continuare a vivere senza che nè morsicatori, nè morsicati vengano soppressi, come avviene dei cani e dei gatti, si dovrebbero avere delle vere epidemie di rabbia nei muridi, ciò che appunto non è mai stato osservato. Anche nelle 40 epidemie di rabbia ricordate dal Fleming e Gordon, le quali risalendo sino all'anno 1271 arrivano fino al 1884 non si fa il più piccolo cenno alla rabbia nei muridi.

4° Se i ratti rappresentassero degli invisibili propagatori della rabbia negli animali, la frequenza di questa malattia non dovrebbe a mio parere, essere così sproporzionatamente minore nel gatto, col quale i ratti vengono più facilmente a contatto, che nel cane.

Neppure così rara dovrebbe forse essere negli equini, bovini, suini, ovini e nel pollame. I ratti infatti assaltano parecchi di questi animali domestici, rosicchiano e perforano il ventre dei porci ingrassati ed i piedi ai tacchini ed alle oche. Una statistica di otto anni (1887-1895) dell'Istituto Pasteur, mentre dà per i cani una percentuale del 93.13 %, pei gatti non arriva che al 5.75 % ed al 0.18 %-0.22 % nei bovini e negli equini e soltanto al 0.02 %-0.07 % nei montoni e nei porci.

5° È quindi più che probabile che il vero e più comune propagatore della rabbia (lasciando da parte il gatto, il lupo e la volpe) sia sempre il cane.

Nei paesi infatti, come la Germania, l'Olanda, la Svezia e la Norvegia ove sono adottate energiche misure preventive, la rabbia è quasi scomparsa nell'uomo e negli animali; ora questo fatto non si dovrebbe così chiaramente avverare se il ratto fosse un vero animale propagatore nell'idrofobia.

6° Infine non pare esista alcun legame tra la diffusione della rabbia in Europa, in Africa ed in America colla comparsa e la diffusione del mus rattus e del mus decumanus. Un tempo i ratti si trovavano confinati nella loro patria, l'Asia centrale e specialmente in Persia ed in India; in Europa, come pure in America, non vi erano ratti, eppure la rabbia era conosciuta sino ai tempi di Celso, Celio ed Aureliano che ne danno una particolareggiata descrizione.

Del mus rattus ne parla per la prima volta Alberto Magno nel XII secolo, ed il mus decumanus compare molto più tardi. Il Pallas racconta che in seguito ad un violento terremoto avvenuto nell'autunno del 1727, questi animali si sarebbero riversati in Europa dalle terre Caspie e dalle steppe. Nel 1732 sarebbero stati trasportati da vascelli in Inghilterra e così si sarebbero sparsi a poco a poco in tutto il mondo.

Roma, 1° ottobre 1906.

Istituto d'Igiene della R. Università di Messina

Sulla tossicità degli anaerobi e sulle condizioni necessarie alla sua produzione.

Ricerche del dott. **PAOLO LOMBARDO PELLEGRINO**, assistente volontario.

Valendomi in gran parte del ricco materiale del Dr. Fornario (1), che nell'Istituto studiava l'*azione tossica dei prodotti putridi di alcune sostanze alimentari*, io ho voluto, completando le ricerche dal punto di vista bacteriologico:

1° Isolare gli anaerobi degl'infusi putridi ed inoculare in vena e per bocca i prodotti solubili elaborati in brodo ed in agar negli animali, per stabilire se sono oppur no tossici.

2° Inoculare gli anaerobi insieme con i loro prodotti elaborati in agar ed in brodo per vedere se sono oppur no capaci di moltiplicarsi negli animali.

3° Coltivare gli anaerobi in sostanze alimentari e poi inoculare i prodotti, per vedere se sono tossici ed inoculare i microbi per vedere se hanno acquistato il potere di produrre tossine.

4° Coltivare gli anaerobi nei filtrati Chamberland dei prodotti della putrefazione di sostanze animali e vegetali per vedere se a contatto di questi prodotti acquistano virulenza o tossicità.

5° Tentare d'immunizzare gli animali contro le sostanze tossiche degli anaerobi.

6° Trovati gli anaerobi tossici, vedere come si comportano le tossine rispetto agli agenti fisici.

I risultati che espongo in questo lavoro non sono l'esplicazione di tutto questo vasto piano di lavoro, pur essendo il frutto di una somma non indifferente di ricerche, di cui è bene sgombrare il campo, per camminare più tardi più spediti e più diretti alla mèta.

Alla produzione della tossicità degl'infusi putridi di sostanze alimentari, concorrono i microrganismi della putrefazione, studiati nella loro azione biochimica da Tissier e Martelly (2), i quali considerano 2 fasi nella putrefazione della carne di bue: 1° *Fase dei fermenti misti proteolici e peptolitici*, che distruggono lo zucchero e attaccano l'albumina. Le proteosi prodotte sono riprese, e la loro distruzione dà l'ammoniaca necessaria a neutralizzare ed alcalinizzare il mezzo (*Micrococcus flavus liquefaciens*, stafilococco albo, *b. coli*, streptococco pyogene, *Diplococcus griseus non liquefaciens*, *B. filiformis* e successivamente *B. perfringens* (anaerobio), *B. bifermentans sporogenes* (anaerobio). 2° *Fase dei fermenti puri proteolitici e peptolitici* che intraprendono l'attacco dell'albumina e dei suoi derivati ultimi (*B. putridus gracilis* (anaerobio), *B. putrificus* (anaerobio), *Diplococcus magnus* (anaerobio) e proteo Zenkerii.

Da ciò si vede come agli anaerobi spetti la parte maggiore e decisiva nella decomposizione delle sostanze proteiche e nella produzione della tossicità.

Il prof. Sanfelice (3) ha costantemente riscontrato negl'infusi putridi di carne, i Protei (*vulgaris* e *mirabilis*) e il bacillo sottile. Le altre forme di microrganismi aerobi non ha creduto studiarle perchè non costanti e perchè isolati ed inoculati in liquidi putrescibili non hanno dato luogo a decomposizione della sostanza organica con produzione di cattivo odore.

Di anaerobi ne ha trovati 9, di cui 5 fondenti e 4 non fondenti: 4 di essi li identificava col *Clostridium foetidum*, col *B. liquefaciens* di Luderitz, col *B. spinosus*, col *B. radiatus*; gli altri descriveva come specie nuove. Del resto i caratteri comuni di questi anaerobi sono: Tutte specie sporigene, tutte le colonie degli anaerobi saprogeni hanno una certa somiglianza tra loro e con quelle dei germi aerobi. Tutti dànno cattivo odore, i più producono gas. Quest'ultima proprietà non deve considerarsi come costante, perchè spesse volte, senza poter dare spiegazione del fatto, non si ha produzione di gas. Per quante ricerche l'A. abbia fatto, non è riuscito di potere isolare altri anaerobi oltre quelli descritti, ciò che dimostra che i germi saprogeni anaerobi, come gli aerobi, formano un gruppo di poche specie.

E infatti gli anaerobi da me isolati dai numerosi infusi putridi di sostanze alimentari, prese in esame, morfologicamente non presentano nulla che possa permettere di ritenerli come specie nuove. Ed è assolutamente impossibile descriverne uno, senza identificarlo con qualcuno dei nove, già descritti dal Sanfelice.

Io perciò distinguerò gli anaerobi dal nome dell'infuso da cui l'ho isolati, raggruppandoli col Sanfelice stesso, in tre tipi, che non si differenziano dai tre anaerobi patogeni: bacillo del tetano, dell'edema maligno, del carbonchio sintomatico, se non per la mancanza di virulenza.

Ma quanto alla loro tossicità il problema è più complesso e senza confronto più difficile.

Al Sanfelice (4) è stato possibile restituire la tossicità a un pseudotetano, coltivandolo in un mezzo contenente tetano-tossina, il che fa pensare che il bacillo del pseudotetano non fosse che il bacillo del tetano diventato atossico: — e tossico divenne il pseudobacillo dell'edema maligno, inoculato insieme con pezzi di organi (fegato, milza, ecc.) raccolti asetticamente da animali appena uccisi; — il che farebbe pensare che in questi organi, indipenden-

temente dalla presenza di microrganismi, avvengano processi di riduzione, per cui si formano sostanze capaci di ridare la virulenza ai pseudobacilli dell'edema maligno (Sanfelice).

Un altro modo di ridare virulenza e tossicità a microparassiti attenuati lo ha indicato il Monti (5), che ha potuto rendere virulento il diplococco, coltivandolo nei prodotti di cultura di un proteo.

Questi mezzi però nelle mie mani, come dimostrerò in appresso, non son serviti a ridare tossicità al bacillus botulinus di Van Ermenghem, che dall'Istituto di Kràl ci è pervenuto atossico — e solo il mezzo adoperato dal Sanfelice per il pseudobacillo dell'edema maligno conferì tossicità al bacillo, per una sola generazione e perciò in via transitoria.

Si sa peraltro che la tossina botulinica si localizza nel sistema nervoso centrale, dando disturbi neuroparalitici; — come in genere tutte le tossine contenute negl'infusi putridi tossici, sono da annoverarsi fra le tossine nervose, dando negli animali un quadro fenomenologico, che il Fornario descrisse accuratamente, e che è in dipendenza di tale localizzazione nei centri nervosi.

Io, col metodo abbastanza noto del Sanfelice, ho isolato anaerobi dai seguenti infusi putridi:

1° Milza maiale; 2° fegato maiale; 3° sangue maiale; 4° cervello maiale; 5° fegato manzo; 6° timo manzo; 7° cervello manzo; 8° ghiandola manzo; 9° sangue manzo; 10° rene manzo; 11° tiroide manzo; 12° testicolo manzo; 13° caffè; 14° ostriche di Taranto; 15° polipo.

Non ne ho invece potuto isolare dai seguenti infusi:

1° Ceci; 2° cavolfiore; 3° mais; 4° pasta; 5° latte; 6° broccoli; 7° riso.

Quest'infusi furono tutti raccolti nel dicembre 1903, e il loro esame fu iniziato nel dicembre 1905-gennaio 1906, a due anni precisi di distanza. Furon tutti conservati allo stesso modo in tubi saldati alla lampada e messi all'oscuro nello stesso armadio.

Dagl'infusi che mi dettero risultato positivo, isolai gli anaerobi putridi, quasi in cultura pura, e poche volte rinvenni in associazione il *Proteus vulgaris*. Nessun altro germe aerobio mi occorse di isolare, nè da ogni infuso isolai più di un anaerobio. Anzi le forme anaerobiche isolate, per i caratteri morfologici e culturali possono aggrupparsi, parecchie forme tra loro, avendo caratteri di somiglianza.

I caratteri comuni a tutti sono: forme sporigene (o a spora centrale, o terminale o a clostridio), immobilità; dalle culture: sviluppo di fetore putrido nauseante, sviluppo di gas, che qualche volta può mancare.

Dagl'infusi che mi dettero risultato negativo, non isolai alcun germe nè aerobio, nè anaerobio. Essi non presentavano il caratteristico odore putrido, nè sviluppo di gas, manifestantesi con la ben

nota piccola detonazione all'apertura del tubo; notavasi invece un caratteristico odore di acido.

Una prima serie di esperienze fu diretta a vedere se quest'infusi avessero dopo tanto tempo conservato la loro tossicità.

I risultati riassumo nella seguente tabella:

Numero d'ordine	INFUSO	Quantità disponibile inoculata in vena — cmc.	Peso dell'animale (conigli) — gr.	Morte dell'animale	Indice relativo di tossicità
1	Testicolo manzo	5	820	+ dopo 22 ore	6.09 °/oo
2	Fegato manzo	4	850	+ dopo 16 ore	4.7 »
3	Ghiandole manzo. . . .	4	785	+ dopo 10 min.	5.09 »
4	Sangue manzo.	3	825	+ dopo 12 ore	3.6 »
5	Rene manzo.	5	850	+ dopo 32 ore	5.8 »
6	Tiroide manzo.	6	887	+ dopo 12 ore	6.7 »
7	Timo manzo	5	1195	+ dopo 8 ore	4.2 »
8	Cervello manzo	5	920	+ dopo 1 ora	5.4 »
9	Fegato maiale.	6	890	+ dopo 1 ora	6.7 »
10	Ostriche Taranto. . . .	4	1220	+ dopo 24 ore	3.2 »
11	Polpo	3	835	+ dopo 48 ore	3.5 »
12	Caffè	3	850	+ dopo 3 giorni	3.4 »
13	Milza maiale	minima	non fu praticata l'esperienza		
14	Cervello maiale				
15	Sangue maiale.				
1	Ceci	5	797	negativo	zero
2	Cavolfiore	4	1305	id.	id.
3	Mais	6	925	id.	id.
4	Pasta	6	712	id.	id.
5	Latte	3	905	id.	id.
6	Broccoli	5	1000	id.	id.
7	Riso	5	850	id.	id.

L'indice di tossicità rilevato nella superiore tabella, è relativo. giacchè è il rapporto fra tossicità e peso per kgr. di animale, ma bisognerebbe tener calcolo anche del tempo in cui la morte dell'animale è avvenuta, tempo che è in ragione inversa della tossicità,

cioè quanto maggiore è la tossicità tanto minore è la durata della vita dell'animale.

E sotto questo rapporto la scala di tossicità diventa:

1° Ghiandole linfatiche, 10 minuti.
2° Tiroide manzo, 12 minuti.
3° Fegato maiale, 1 ora.
4° Cervello manzo, 1 ora.
5° Timo manzo, 8 ore.
6° Sangue manzo, 12 ore.
7° Fegato manzo, 16 ore.
8° Testicolo manzo, 22 ore.
9° Ostriche Taranto, 24 ore.
10° Rene manzo, 32 ore.
11° Polpo, 48 ore.
12° Caffè, 3 giorni.

Le tabelle necroscopiche degli animali di questa 1ª serie di esperienze, non mostrano nulla di significante, nè dagli organi ho potuto isolare l'anaerobio inoculato coll'infuso, meno che nelle esperienze 1ª e 4ª in cui dalla milza ho potuto isolare un anaerobio del tutto simile a quello isolato dai rispettivi infusi putridi, *Testicolo manzo* e *Rene manzo*.

Questi due bacilli, che han mostrato di avere potere patogeno, congiunto a mediocre potere tossico, hanno, in cultura, una grossa spora centrale, sporgente dai margini bacillari, ad estremità arrotondate. Fondono la gelatina molto lentamente, dimostrando di avere un fermento proteolitico poco attivo. In cultura in agar hanno l'aspetto di una spazzola da tubi, e sin dalla 2ª giornata producono abbondanti bolle di gas, che spezzettano e talora fendono la colonna di agar; sviluppano un odore nauseabondo caratteristico.

I due bacilli sono fra loro identificabili e hanno caratteri di somiglianza col *Clostridium foetidum*.

Coltivato questo bacillo in brodo e inoculato in vena e sottocute, uccide gli animali di prova rispettivamente in 16 e 21 giorni, con questi reperti:

Coniglio di gm. 1460. Inoculazione in giugulare dell'anaerobio. Rene manzo coltivato in brodo. Dopo 20 cmc. l'animale ha tachicardia, dispnea, esoftalmo, contratture grido. A 85 cmc. emissione di urine e feci, il respiro a tipo Cheine-Stokes. A 100 cmc. sospesi, avendo preso questa cifra come limite massimo. Il coniglio sembra morto, respira appena. Sciolto dal letto operatorio e deposto sul tavolo, dopo qualche ora si rimette un poco, ma mostra il treno posteriore paralitico; dopo 4 ore il ritmo respiratorio si fa più regolare, ma il coniglio non riacquista la sua vivacità nemmeno dopo 24 ore. Dopo 48 ore il coniglio può muoversi in maniera normale. Muore dopo 16

giorni e pesa gm. 1305. Al collo sulla ferita operatoria. per qualche poco di liquido sfuggito prima d'infilzare con l'ago-cannula la vena, notasi un ascesso ben circoscritto con pus densissimo biancastro. Un altro ascesso con pus che mostra gli stessi caratteri, si riscontra all'arto posteriore destro. Gli organi non mostrano nulla degno di nota. Nel pus dell'ascesso al collo notansi forme bacillari piccole diritte, ad estremità arrotondite; nel pus dell'ascesso della gamba e nella polpa splenica notansi bacilli grossi di media lunghezza analoghi ai bacilli inoculati.

Che le sostanze tossiche avessero potere piogeno, indipendentemente dalla presenza di germi viventi, è cosa nota (Bouchard) e che molti fra gli anaerobi putridi avessero tale azione, è cosa che io stesso ho potuto più volte accertare: ma il fatto degno di nota nel superiore reperto, è la localizzazione dei germi inoculati, alla gamba, in un punto che forse per la legatura un po' stretta rappresentava un *locus minoris resistentiae*, riproducendo un ascesso con gli stessi caratteri di quello analogo al collo.

La seconda serie di esperienze riguarda la coltivazione degli anaerobi putridi in brodo comune e la inoculazione dei brodi-cultura in vena.

Il metodo da me usato per la cultura degli anaerobi in mezzi liquidi è semplicissimo e rispose costantemente bene alle esigenze di una tecnica speciale, rigorosa e di difficile manualità.

In un fiasco comune a collo molto lungo, ripieno per metà del liquido di cultura, previamente sterilizzato come di consueto, io procedevo alla seminagione dell'anaerobio, gettandovi rapidamente piccoli dischi di agar di una cultura dell'anaerobio stesso. Quindi rapidamente introducevo un tubo di vetro sterile, piegato nell'ultimo tratto superiore ad angolo retto, il quale tubo pescava nel liquido sin quasi il fondo del fiasco. Per la estremità ripiegata il tubo era innestato a un tubo di gomma in comunicazione con la conduttura del gas illuminante. In corrispondenza della bocca del fiasco era circondato dall'ovatta che serviva da tappo del fiasco stesso.

Siccome la pressione del gas della conduttura stradale non era quasi mai sufficiente a vincere la pressione del liquido del fiasco e della colonna di aria soprastante, io innestavo fra il tubo di vetro e la conduttura di gas un apparecchio di gomma a due pere, dei comuni polverizzatori.

Disposto così l'apparecchio (e la manovra è rapida e sicura, perchè tutto si predispone in antecedenza e il tubo di vetro che deve pescare nel liquido si tiene pronto, coi descritti raccòrdi, in una provetta comune sterile) manovrando l'apparecchio di Richardson, del comune polverizzatore, spingevo il volume di gas, più o meno energicamente, a volontà, facendolo gorgogliare nel liquido, e sostituendo così l'aria del liquido culturale e del fiasco, che veniva spinta fuori attraverso il tappo di ovatta, che veniva così a sostituire il tubo di emissione degli altri apparecchi. La manovra ha termine dopo 10-15 minuti, quando cioè per circa 5 minuti, attraverso il tappo non passa che gas illuminante, percepibile distintamente all'odore caratteristico. Si spinge allora, con due, tre colpi, del gas con maggiore violenza, in modo

da sollevare grosse bolle, a mo' di spuma, che sulla superficie del liquido facciano da strato protettivo; si ritira rapidamente il tubo di vetro, abbassando col dito il tappo di cotone, si riscalda appena il collo del fiasco e per maggiore precauzione si sovrappone un cappuccio di gomma. Indi si salda il collo alla fiamma. Il riscaldamento di un punto del collo del fiasco, per la dilatazione dei gas al calore, impedirebbe l'entrata dell'aria anche se la bocca del fiasco non fosse chiusa, prima dal dito e poi dal cappuccio di gomma. E l'unico inconveniente del metodo è proprio dovuto alla dilatabilità del gas contenuto nel fiasco, il quale provoca scoppi che frantumano il collo del fiasco e mandano a monte ogni cosa, quando non si procede cautamente al saldamento del collo del fiasco, alla fiamma della soffieria.

Come limite massimo da inoculare in vena, ho stabilito cmc. 100 di brodo-cultura tenuto 10 giorni in stufa a 37°, in cui lo sviluppo dell'anaerobio si fa evidente per l'intorbidamento del brodo, e poi per lo sviluppo di gas e la produzione di odore putrido nauseante.

Al di là di questo limite, non ho creduto di spingermi, perchè una sostanza tossica, quando è tale, deve uccidere l'animale dopo pochi cmc.

Per inoculare il liquido, in quantità determinata, mi son servito di una comune provetta di Mohr, a chiavetta, innestandovi un tubo di gomma, all'altra estremità del quale stava l'ago canula montato su un corto tubo di vetro.

Le inoculazioni praticate in serie, su conigli di peso medio di gr. 900-1300, mi diedero costantemente risultato negativo.

La costanza del risultato mi fa concludere che gli anaerobi putridi coltivati nel comune brodo non sono tossici.

È inutile dire che io ho ogni volta riisolato l'anaerobio dal brodo-cultura, facendo innesti di agar, per accertarmi, come controllo, dello sviluppo del germe e della purezza della cultura.

Anche il b. botulinus di Van Ermenghem, che da Kràl ci venne atossico, coltivato in brodo e inoculato nel modo anzidetto in animali di prova, dette risultato negativo.

Per questo, nei successivi esperimenti, io l'ho scelto quasi come il prototipo degli anaerobi putridi, e per semplificare la tecnica e procedere più speditamente, ho operato soltanto su di esso, salvo a provare su gli altri anaerobi putridi, da me isolati, quando lo credevo opportuno.

E negative furono le inoculazioni gastriche in *cani*, dei brodi-cultura degli anaerobi putridi e del botulinus.

Giova però rilevare che i conigli inoculati in vena nel modo anzidetto, morirono quasi tutti in un tempo variabile fra 5 e 20 giorni, con reperto necroscopico e bacterioscopico negativo: il che

se fa forse pensare ad una intossicazione cronica, esclude in maniera assoluta la moltiplicazione dei germi inoculati, nell'organismo animale.

***

Le inoculazioni sottocute e nel peritoneo di culture in agar degli anaerobi putridi e del botulinus riuscirono anche negative, come le somministrazioni di intere culture in agar per via gastrica in cani, sia sole, sia mescolate a cibi, come a sostanze alimentari putrefatte.

Evidentemente quindi i mezzi ordinari di cultura non erano i meglio adatti a conferire tossicità ai 15 anaerobi putridi da me isolati, e al *Bacillus botulinus*.

Orientai allora le ricerche nel senso di scoprire un mezzo capace di dare tossicità agli anaerobi putridi, e, come avvertii, scelsi come prototipo il *botulinus*.

***

Mezzi solidi. — Siccome come è noto il Van Ermenghem isolò il suo bacillo da un prosciutto, io cercai di ridargli virulenza coltivandolo in questo mezzo.

Riferisco il procedimento seguito, perchè fu lo stesso press'a poco per tutte le esperienze di questa serie.

In un pezzo di circa gm. 300 di prosciutto con un ago rigido di filo di ferro, innestai in più parti il bacillo di una cultura di agar recente di 48 ore; il pezzo quindi veniva messo in una camera umida di cristallo e messo in stufa a 37°, in un altro cristallizzatore ponevo un pezzo di prosciutto da servire per controllo. Già dopo 24 ore nel prosciutto controllo si iniziava il processo di putrefazione con ingiallimento del grasso e rammollimento, e odore specifico di putrefazione; nel prosciutto inquinato si avvertiva l'odore di putrido caratteristico dell'anaerobio, ma i caratteri esteriori erano migliori. In 3ª giornata li tolgo dalla stufa e procedo all'isolamento dei germi col metodo consueto.

Dal prosciutto inquinato isolo: 1° il B. botulinus e di germi aerobi il proteus vulgaris e il proteus Zenkerii.

Dal prosciutto controllo isolo: 1° un b. sottile; 2° un B. proteo volgare; 3° un Micrococcus albus; 4° un diplobacillo capsulato; 5° un B. mucosus; nessun anaerobio.

I due pezzi poi li diedi a mangiare a due cani press'a poco della stessa taglia, e il botulinus isolato lo inoculai sottocute a un coniglio: esito negativo.

Lo stesso procedimento seguii adoperando salsiccie da fresco preparate, salsiccie salate, salsiccie affumicate, carne di manzo, fresca e putrefatta, fegato di manzo, sanguinaccio, uova crude e sode. Ho dato a mangiare ai cani queste sostanze, adoperando sempre un controllo, con esito costantemente negativo.

Il b. botulinus isolato da questi mezzi svariati e inoculato sottocute non si mostrò mai tossico.

Volli allora ripetere l'esperienza del prof. Sanfelice per restituire virulenza al pseudobacillo dell'edema maligno, e nella tasca cutanea praticata nel coniglio insieme col disco di agar contenente il b. botulinus, innestai un pezzo di fegato di coniglio (morto per penetrazione di bolla di aria in vena).

L'animale così inoculato morì in 3ª giornata e il cadavere presentava notevole opistotono, senza alcuna lesione apparente agli organi interni, e al sito d' inoculazione una polpa diffluente ricca di bacilli.

Questa polpa raccolta asetticamente e diluita in 10 cmc. di acqua venne inoculata in vena e diede la morte del coniglio in meno di 12 ore. Ma il *B. botulinus* isolato da questa polpa e saggiato, aveva perduto ogni tossicità.

Ritentai la prova innestando contemporaneamente il b. botulinus e mezzo tuorlo d' uovo sodo, e l'animale muore in 4ª giornata; ma anche stavolta il *B. botulinus* riisolato e saggiato non fu tossico.

Queste due esperienze confermano l' ipotesi del Sanfelice, che cioè nella decomposizione della sostanza organica, indipendentemente da altri microrganismi, si devono formare prodotti di disintegrazione capaci di dare tossicità al bacillo; è da credere altresì che non sia del tutto estranea l'attività del bacillo stesso nella produzione delle sostanze tossiche; che nell' inoculazione della polpa diluita in vena, non si è fatto in sostanza che trasportare della tossina, quantunque diluendola, in dose sempre mortale; che infine il *B. botulinus* non si moltiplica negli animali.

Quanto ai cani cui diedi a mangiare tutte le superiori sostanze inquinate nel modo detto, l'esito, come dissi, fu costantemente negativo: nè valse l'averli lasciati in precedenza digiuni per 48 ore, l'avere neutralizzato con carbonato di soda l'acidità del succo gastrico, l'avere dato insieme con le sostanze inquinate, culture intere di *botulinus* in agar.

Una volta sola un cane, dopo un digiuno di 2 giorni, mangiò con avidità 10 uova sode inquinate, si mostrò un po' abbattuto per due ore e guaiva lamentosamente come in preda a dolori; però dopo questo tempo si rimise completamente.

***

Il *botulinus* nelle uova sode si coltiva molto bene e già dopo 24 ore sviluppa tanta quantità di gas da rompere il guscio. Lungo la linea d' innesto si rammollisce il tuorlo e diventa verdastro con produzione di un fetore nauseante caratteristico. Man mano che cresce lo sviluppo del bacillo così il tuorlo si rammollisce e diventa fetido fino a che si trasforma in una poltiglia diffluente verdastra. L'albume non è intaccato dal bacillo, e solo si frantuma per lo sviluppo di gas.

Anche gli altri anaerobi putridi da me isolati si coltivano bene in questo mezzo, e inoculati in vena insieme col tuorlo diluito in acqua uccidono l'animale; dati a mangiare, no. L'anaerobio riisolato dall'uovo non è tossico.

***

Mezzi liquidi. — Avendo, come dissi, fallito l'esperienza nell'ordinario brodo di cultura, io pensai di addizionarlo col 5 % di peptone e vi coltivai il *B. botulinus*.

Il *botulinus* diventa tossico o bastano cmc. 11 inoculati in vena per uccidere istantaneamente un coniglio di 1255 gr., con la fenomenologia nota.

Coltivo allora nello stesso mezzo e nello stesso modo *l'anaerobio fegato di maiale*, e bastano cmc. 13 ½ per uccidere in pochi minuti un coniglio di gr. 1180.

Sicchè anche questo anaerobio diventa tossico.

Prima di sperimentare su l'intera serie di anaerobi isolati dagl'infusi putridi, volli vedere se tanto il *botulinus*, quanto l'anaerobio fegato di maiale, riisolati, conservassero la loro tossicità; ma il risultato fu negativo.

Il che dimostrerebbe che i prodotti tossici si formerebbero per l'attività biochimica di questi bacilli anaerobi sulle sostanze proteiche, ma che quando queste sono in minima quantità, come nell'agar, non si formano prodotti tossici in tale misura da dare la morte.

Quanta differenza con la tetanotossina, mortale a dosi imponderabili!

Introdotto il brodo peptonato con *botulinus*, mercè una sonda gastrica, nello stomaco dei cani, ebbi risultato negativo.

Maciullai del fegato di manzo con ugual peso di acqua distillata e poco cloruro di sodio per alcalinizzare, e lo divisi in due fiaschi, in uno dei quali seminai il *botulinus*, l'altro lasciai per controllo, e perchè fossi nelle identiche condizioni di esperimento, anche nel fiasco controllo feci gorgogliare del gas illuminante nel modo detto.

Dopo 10 giorni di stufa filtrai i due liquidi grossolanamente con un poco di cotone idrofilo, e inoculai in vena con questi risultati:

Coniglio gr. 980, filtrato fegato inquinato, morte con cmc. 1 ½.

Coniglio gr. 1065, filtrato fegato controllo, morte con cmc. 9.

Come si vede anche il fegato controllo mostrò di avere un basso indice di tossicità, e da esso oltre cocchi, sottile e protei, isolai un anaerobio: la differenza nell'indice di tossicità parla a favore di una maggiore tossicità del *B. botulinus*, che sin dal primo giorno attaccò la materia organica elaborando una tossina specifica.

Dato a mangiare ai cani i due fegati, insieme col rimanente dei filtrati, l'esito fu negativo.

Il *botulinus* riisolato e inoculato sotto cute diede esito negativo.

A questo punto io tento la cultura del *botulinus* in agar fortemente peptonato, e il modo di preparazione è facile intenderlo. In questo mezzo però lo sviluppo del bacillo è scarso e stentato, nè saprei indicar la ragione. Però inoculato un grosso disco di agar peptonato contenente il bacillo, in una tasca cutanea di coniglio, ho la morte dell'animale in 12ª giornata, senz'altro reperto necroscopico che un ascesso circoscritto al sito d'inoculazione, contenente pus lattescente. In questo pus vi era abbondanza di forme bacillari, rigide, diritte, sottili, che si isolano (insieme con un proteo) in culture anaerobiche. Ma nel secondo passaggio in agar ordinario, questo bacillo perde la sua mediocre tossicità, diventando completamente inoffensivo.

I risultati avuti col peptone mi hanno incoraggiato a persistere a sperimentare con le sostanze estrattive della carne, e adoperai per questa serie di esperienze l'estratto di carne Liebig.

E avendo avuto risultati positivi, coltivando nell'estratto Liebig il *B. botulinus*, estesi la ricerca ad alcuni degli anaerobi putridi, e

per logica sperimentale, completai la serie con una soluzione di Liebig, lasciata sterile e tenuta nelle stesse condizioni, per servire da controllo, essendo noto che è tossica per sè stessa inoculata in vena; e con una soluzione inquinata con aerobi banali (sottile e proteo).

I risultati riassumo in questa scala dei rispettivi indici di tossicità:

1° Liebig soluzione 10 %, sterile, 9.9 ‰.
2° Liebig soluzione 10 %, con sottile e proteo, 8.2 ‰.
3° Liebig soluzione 10 %, con anaerobio caffè, 6 ‰.
4° Liebig soluzione 10 %, con milza maiale, 5.08 ‰.
5° Liebig soluzione 10 %, con cervello maiale, 5.06 ‰.
6° Liebig soluzione 10 %, con *b. botulinus*, 3.6 ‰.

Elevando il titolo della soluzione dell'estratto di carne, adoperando cioè una soluzione al 15 % e seminandovi il *botulinus*, la tossicità aumenta, e l'indice è di 2.4 ‰. La presenza maggiore o minore in stufa delle culture, cioè lo sviluppo del microrganismo, ha anch'essa un certo valore nella determinazione dell'indice di tossicità, come si può vedere dal seguente specchietto riassuntivo:

1° Fiasco, *botulinus* in Liebig 10 % tenuto 5 giorni in stufa, indice tossico 4.5 ‰.

2° Fiasco, *botulinus* in Liebig 10 % tenuto 10 giorni in stufa, indice tossico 3.8 ‰.

3° Fiasco, *botulinus* in Liebig 10 % tenuto 15 giorni in stufa, indice tossico 3 ‰

4° Fiasco, *botulinus* in Liebig 10 % tenuto 20 giorni in stufa indice tossico 3.2 ‰.

L'ultima cifra dà un valore centesimale insignificante attribuibile forse a piccola inesattezza di tecnica.

Riisolato il *botulinus* dalle soluzioni Liebig, e inoculato sottocute, col sistema del disco di agar, uccide l'animale in 4ª giornata, quindi è tossico. Ma nelle seminagioni successive perde il suo potere tossico.

La ragione per cui così presto debba perdere la sua virulenza, mi sfugge, nè voglio avanzare ipotesi, bastandomi per ora di accertare i fatti osservati, che sono sino a un certo punto dimostrativi per sè stessi.

Introducendo nello stomaco dei cani le soluzioni di estratto di carne Liebig, inquinate col *botulinus*, o con uno degli anaerobi pu-

tridi su indicati, si ha constantemente il vomito dopo 10-30 minuti, vomito violento della sostanza introdotta accompagnato da emissione di molto muco.

Lo stomaco del cane si mostra quindi intollerante e rigetta una sostanza che forse è nociva al suo organismo.

Per risolvere la quistione, pratico in un cane la laparotomia e introduco la soluzione Liebig col *botulinus,* nel duodeno, mercè un ago canula, nella quantità di quasi 200 cmc. Il cane sopporta bene l'operazione e sopravvive.

In un 2° cane pratico la laparotomia e l'enterotomia e introduco due culture intere di *botulinus* in agar, riisolato dalle soluzioni Liebig, e quindi tossici; avendo cura di spappolare l'agar nell'interno dell'intestino. Anche in questo caso il cane se la porta bene.

Queste due esperienze provano che il cane è per la via gastroenterica assolutamente refrattario agli avvelenamenti da tossicosi putride, per lo meno alle dosi da me esperimentate.

***

Nell'estratto di carne Liebig vi è carnina, creatina, creatinina, xantina, ipoxantina, ecc., e poichè con esso ebbi risultati positivi, per quanto non stabili nelle generazioni di *b. botulinus* successive alla prima, era naturale vedere se a contatto di queste sostanze il *botulinus* e gli altri anaerobi putridi riacquistassero tossicità, e così saggiai la creatina purissima di Merck.

Ma di queste serie importantissima di ricerche è prematuro riferire in questa nota gli scarsi, ma incoraggianti, risultati avuti.

***

Mi resta a riferire una serie subordinata di esperienze intese a dimostrare se il *b. botulinus* abbassi il coefficiente urotossico di una urina normale.

Un'esperienza preliminare mi ha assicurato che un chilo di coniglio non muore che con 150 cmc. dell'urina impiegata. Il *botulinus* in quest'urina alcalinizzata e sterilizzata, si coltiva bene, e un chilo di animale è ucciso da cmc. 21 di urina inquinata: quindi essa è incomparabilmente più tossica.

Ma il *botulinus* riisolato dà risultati negativi.

Conclusioni.

1° Gli infusi putridi di svariate sostanze alimentari conservano la loro tossicità anche al di là dei limiti segnati da altri osservatori: e questa tossicità pare sia mantenuta dagli anaerobi in essi contenuti quasi in cultura pura.

Infatti gli infusi da cui non mi è stato possibile isolare alcun anaerobio non erano più tossici.

2° I prodotti elaborati dagli anaerobi, in cultura in brodo e in agar, glicerinato e glucosato, non si mostrarono tossici per nessuna delle vie di inoculazione tentate (sottocutanea, peritoneale, endovenosa, gastrenterica).

Questo risultato parrebbe in contradizione con la conclusione precedente, ma la contradizione è solo apparente, perchè negli infusi *in toto* ci sono sostanze riduttive tossiche, compatibili con l'esistenza degli anaerobi, sostanze che questi microrganismi non sono capaci di elaborare nelle culture in brodo e in agar.

Il *b. botulinus* perde anch'esso ogni potere tossico, coltivato negli ordinari terreni di cultura.

3° Gli anaerobi putridi inoculati insieme con i loro prodotti elaborati in brodo e in agar, non sono capaci di moltiplicarsi sull'organismo animale, meno forse l'anaerobio *rene manzo* che diede un ascesso metastatico e fu riisolato dalla milza.

4° Non è il sale (cloruro di sodio) in soluzioni più o meno concentrate, che dà tossicità al *botulinus*: questo bacillo doveva preesistere nella carne con cui fu manipolato il prosciutto, da cui fu isolato. Il sale però, alcalinizzando il terreno di cultura, conserva vivo e vitale il bacillo.

5° Non è l'associazione di *protei* e di altri germi della putrefazione, nè dei loro prodotti elaborati in brodo, che mostra di esaltare la virulenza del *botulinus*.

6° Il *botulinus* e gli altri anaerobi putridi diventano tossici in presenza di sostanze proteiche ed estrattive della carne. Ma non mi è stato possibile determinare se la tossina viene elaborata dal *b. botulinus* in presenza di queste sostanze, o è dovuta a processi di riduzione di dette sostanze in presenza del bacillo.

I fatti accertati sino al momento, parlano in favore di questa seconda ipotesi.

7° Gli anaerobi coltivati nelle sostanze alimentari non dànno

prodotti tossici che nell'uovo sodo, nell'infuso di fegato, nel brodo peptonato e sopratutto nelle soluzioni di estratto di carne Liebig.

Il titolo della soluzione o della diluizione è in rapporto diretto con l'indice di tossicità, come pure lo stesso rapporto c'è, sebbene meno appariscente, fra indice di tossicità e sviluppo dell'anaerobio.

LAVORI CITATI.

1. FORNARIO. *Sull'azione tossica dei prodotti della putrefazione di alcune sostanze alimentari.* Questi Annali, anno 1906, fascicolo II, pag. 215.
2. TISSIER e MARTELLY. *Recherches sur la putrefaction de la viande de boucherie.* Annales de l'Institut Pasteur, n. 12, pag. 865, dicembre 1902.
3. SANFELICE. *Contributo alla morfologia e biologia dei bacteri saprogeni aerobi e anaerobi.* Estratto dagli Atti della R. Accademia medica di Roma, anno XVI, volume V, serie II, anno 1890.
4. SANFELICE. *Sulla tossicità degli anaerobi del terreno.* Questi Annali, volume II (nuova serie), fascicolo III.
5. MONTI. *Influenza dei prodotti tossici dei saprofiti sulla restituzione della virulenza ai microparassiti attenuati.* Atti della R. Accademia dei Lincei, 1889, volume II, n. 7.

Istituto d'Igiene della R. Università di Messina

Sulla pseudotubercolosi negli animali a sangue freddo.

Ricerche del dott. **PAOLO LOMBARDO PELLEGRINO,**
assistente volontario.

(Con la tav. XI).

Lo studio della tubercolosi negli animali a sangue freddo ha oltrepassato i confini della ricerca biologica, parendo per questa via di poter trovare un vaccino immunizzante.

Certo è però un argomento molto interessante.

Lubarsch (1) stabilisce: 1° I bacilli iniettati in un sacco linfatico di rana passano rapidamente negli organi e vi persistono molto tempo, settimane e mesi.

2° Nel luogo d'innesto è possibile osservare talora l'accenno di una formazione tubercolare, mentre che negli organi non si ha alcun accenno di reazione.

3° I bacilli che dimorano così a lungo negli organi, perdono in parte la loro virulenza, in modo da non ridare subito la tubercolosi in una cavia, ma la loro attenuazione è soltanto passeggiera.

Friedmann (2) dopo aver pubblicato due casi di tubercolosi spontanea nella tartaruga, si occupa delle proprietà del bacillo isolato, il quale si differenzia dai più prossimi bacilli acidoresistenti, cioè dal bacillo tubercolare dei pesci (Bataillon, Dubard, Terre), dal bacillo tubercolare di Moeller modificato attraverso il passaggio della mucosa del cieco (Moeller) e dal bacillo tubercolare di Koch modificato attraverso il passaggio nell'organismo delle rane (Bataillon, Lubarsch e Dieudonné); viceversa si avvicinerebbe al bacillo della tubercolosi umana e al bacillo del morbo porlaceo.

Con questo bacillo recentemente è riuscito ad immunizzare attivamente le cavie contro la tubercolosi dei mammiferi.

Herzog (3) studia l'attenuazione del bacillo tubercolare dei mammiferi nell'organismo degli animali a sangue freddo, e ne spiega la ragione con due ipotesi: o i bacteri incorporati nell'organismo dell'animale a sangue

freddo vengono distrutti gradatamente dall'organismo, cosicchè per quanto più a lungo duri questa lotta, tanto meno materiale infettivo viene inoculato all'animale a sangue caldo e il tempo di resistenza, il quale manifestamente e gradatamente si prolunga, si spiega con una continua diminuzione nella massa di bacilli iniettati; oppure i bacteri inoculati sono rimasti nello stesso numero durante il loro soggiorno nel corpo dell'animale a sangue freddo, hanno però perduto della loro virulenza ed hanno bisogno di maggior tempo per riacquistare la loro patogenicità per gli animali a sangue caldo.

Ad ogni modo pare dimostrato che una diminuzione della virulenza dei bacilli tubercolari negli animali a sangue caldo, ha luogo dopo lungo soggiorno negli animali a sangue freddo; e il bacillo tubercolare modifica alquanto le sue proprietà culturali, fino a vegetare saprofiticamente.

Moeller (4) dice di essere riuscito ad immunizzare delle cavie contro la tubercolosi dei mammiferi, con il suo acidoresistente I, passato attraverso un animale a sangue freddo.

Bertarelli (5) in un varano ha sperimentato il bacillo della tubercolosi umana, inoculando direttamente dello sputo di un tisico, e pur ottenendo una attenuazione del germe, riconosce di non avergli conferito proprietà vaccinanti.

E tali proprietà negano al bacillo di Friedmann, Libbert e Ruppel (6).

Io, riferendomi ai rapporti di parentela esistenti fra il bacillo della tubercolosi umana, i bacilli acidoresistenti e le *streptothrix*, e rilevando che tanto i bacilli trovati nei casi di tubercolosi spontanea degli animali a sangue freddo, quanto coltivando in essi il bacillo tubercolare dei mammiferi, non si ha da fare che con *acidoresistenti*; mi son proposto di studiare il comportamento di questo gruppo di germi negli animali a sangue freddo, al fine di intendere in una comprensione sistematica, alcuni fra i complessi fenomeni biologici, che si connettono al grande problema della tubercolosi.

Nella categoria di *bacilli acidoresistenti*, io intendo non già quei bacilli i quali, per artificio di tecnica, possono acquistare la proprietà di resistere agli acidi, in modo transitorio o anche acquisito alla specie, sempre transitoriamente per una, al massimo due generazioni, come io stesso ebbi a dimostrare (7).

Per *bacilli acidoresistenti*, propriamente detti, bisogna intendere un gruppo ben determinato di germi, i quali per i loro caratteri morfologici, culturali, biologici e patogenetici, e per la loro reazione colorante specifica, debbono aggregarsi alla grande famiglia delle streptothricee, cui pure appartiene, com'è noto, il bacillo di Koch.

Non credo ozioso insistere su questo concetto: 1° perchè dovendo intrattenermi della *pseudotubercolosi* negli animali a sangue freddo, bisogna ben determinare il gruppo di germi capaci di produrla,

giacchè, come si sa, questa forma morbosa può essere data, per non parlare della pseudotubercolosi zoogleica (Malassez e Vignal) dal bacillo opale agliaceo (Vincenzi), da aspergilli e mucorinee e anche da polveri inerti.

E di passata io crederei meglio appropriato il nome di *paratubercolosi* alla forma morbosa determinata da germi, che han rapporti di parentela col bacillo di Koch, riservando quello di *pseudotubercolosi* alle altre forme anatomo-patologiche, che pur avvicinandosi ai granulomi, sono provocati da germi o da sostanze. che non hanno nulla a vedere col bacillo di Koch;

2° perchè anche recentemente mi è stato dato di leggere che non è lecito creare in bacteriologia un gruppo che meriti veramente il titolo di pseudotubercolare, giacchè si riuniscono sotto tale designazione una folla di microbi che non hanno di comune che un solo punto: la reazione colorante, mentre si differenziano per tutte le altre proprietà.

Ebbene, ciò non è.

Io, messo sulla diritta via dal prof. Sanfelice, che in un suo lavoro (8) distingueva le *streptothrix* a seconda della proprietà che esse hanno di resistere alla decolorazione con gli acidi in toto, in parte o niente affatto, constatazione fatta anche da Fuchs (9); cominciai con la constatazione che il più celebre fra i cosidetti bacilli pseudotubercolari, quello Petri-Rabinowitsch, non era che una *streptothrix*.

Coltivando poi queste nei grassi ho potuto sorprendere l'aspetto bacilliforme che esse assumevano in questo mezzo di cultura e la proprietà di resistere agli acidi, acquisita anche dalle specie ordinariamente non resistenti.

Studiando quindi i vari *bacilli acidoresistenti* (10) isolati da vari autori e che ho richiesti al laboratorio di Kràl, nonchè quelli isolati dal direttore, da me e da vari compagni di studio, in questo Istituto d'Igiene della regia Università di Messina; ho potuto dimostrare che essi formano un gruppo organico, in filiazione diretta dalle *streptothrix*. Essi in sostanza non sono che *streptothrix* bacilliformi; e se il fenomeno dell'acidoresistenza essi l'han comune con germi banali coltivati artificiosamente; per i loro caratteri morfologici, culturali, biologici e patogenetici, indipendentemente della reazione colorante, formano una famiglia ben distinta di germi.

E quand'anche non bastassero i caratteri di somiglianza a formare un aggruppamento sistematico, ho potuto avere la prova sperimentale diretta; ottenendo da due *streptothrix*, la *Eppinger* e la

viridis, che sono fra le più costanti e tenaci nei caratteri culturali e morfologici, due acidoresistenti o *streptothrix* bacilliformi, che ho contradistinto *ex Eppinger* e *ex viridis*; e viceversa da queste *ex streptothrix*, due *streptothrix*, che a vero dire non sono identiche alle originarie *Eppinger* e *viridis*, ma tampoco si possono comparare ai pseudotubercolari o *streptothrix* bacilliformi, da quelle ottenuti; giacchè l'*ex viridis* ha assunto l'aspetto di una *streptothrix alba* resistente in toto (mentre le albe non resistono agli acidi) a coloniette puntiformi, come polverulente, bianco-opache, di cui qualcuna invecchiando diventa giallo-rosea: la *ex Eppinger,* ridiventata *streptothrix*, si avvicina più alla *streptothrix* gialla con colonie poco sviluppate.

Questo gruppo di germi è quindi, insieme col bacillo di Koch, molto ben determinato, e appartiene alla grande famiglia delle streptotricee.

Sono questi i germi capaci di dare una paratubercolosi, e che ho saggiato negli animali a sangue freddo, proponendomi, per ora, i seguenti quesiti:

1° Le *streptothrix* e i bac. acidoresistenti, sono patogeni per gli animali a sangue freddo?

2° Nel passaggio attraverso un organismo a sangue freddo tali germi si sono attenuati rispetto agli animali a sangue caldo, e hanno assunto proprietà vaccinanti?

3° Le lesioni che determinano negli organismi a sangue freddo sono analoghe a quelle che essi determinano negli organismi a sangue caldo, o si discostano in qualche particolarità dal tipo dei granulomi tubercolari?

In una successiva memoria mi proporrò di studiare se questi germi passati attraverso l'organismo di un animale a sangue freddo assumano proprietà vaccinanti rispetto al bacillo della tubercolosi umana.

Limitando così la ricerca io ho creduto di renderla più metodica e organica, giacchè giova per ora sapere il modo di comportarsi delle *streptothrix* e degli acidoresistenti nel corpo degli animali a sangue freddo.

Già sappiamo che in questi organismi c'è una forma di tubercolosi, e ciò per le su citate ricerche del Friedmann sulle tartarughe, per il caso di Rupprecht (11) che ebbe ad osservare un caso di tubercolosi spontanea in una rana, la cui sede era il fegato, con formazione di piccoli nodi (ascessi). Da questi nodi l'A. isolò due bacilli acidoresistenti; e per la notizia data dal Bertarelli, per quanto comunicata come *relata* di casi di tubercolosi nei rettili. E ciò senza parlare della tubercolosi dei pesci (Bataillon, Dubard, Terre).

Questo acuisce sempre più l'interesse per uno studio della paratubercolosi sperimentale, che è quella che, come avvertimmo, si avvicina di più alla tubercolosi spontanea degli animali a sangue freddo, da cui non si sono isolati che acidoresistenti.

Le mie ricerche le ho compiute sui rospi (*bufo vulgaris*), sulle rane (*rana esculenta*), sulle tartarughe (*testudo graeca*) e sulle lucertole (*lucerta agilis*).

I *pseudotubercolari* impiegati furono: i cinque della Tobler, quello della Rabinowitsch, i due di Moeller e i sette da me isolati; delle *streptothrix*, la *Eppinger* e la *viridis*.

Le inoculazioni nei rospi le praticai sotto la cute del dorso, nelle rane in addome, nelle lucertole pure in addome, nelle tartarughe sotto la cute del dorso e in vena.

Per adesso mi limiterò a riferire i risultati avuti nei rospi, nelle rane e nelle lucertole.

Rospi. — Sono fallite le esperienze di inoculazione con il bacillo della Rabinowitch, del Grasbacillo II di Moeller, del mio V, perchè i rospi sono morti dopo 2 giorni dall'inoculazione senza poterne accertare la causa.

Le altre prove sono state tutte positive.

Rospo. Streptothrix viridis. — Inoculato in addome muore in 20ª giornata dall'inoculazione. L'animale è molto dimagrato e presenta sulle sierose peritoneali numerosi piccoli noduli isolati, rotondeggianti, grossi al massimo quanto una capocchia di spillo, di colore grigio perlaceo. Due noduli piccoli si trovano alla superficie del polmone destro, entrambi i polmoni hanno gli apici evidentemente infiltrati. Il fegato è di aspetto normale ma sulla faccia posteriore notasi qualche nodulo grigio perlaceo. La milza ingrossata, iperemica, con follicoli linfatici appariscenti come punticini bianchi. Reni di aspetto normale.

Si fa un preparato di uno di tali noduli col metodo Ziehl-Gabbet, e si vede la *streptothrix* con l'aspetto normale. Si fanno culture di uno di questi noduli con i metodi consueti e si riottiene la *streptothrix viridis* quasi in cultura pura.

La *streptothrix* riisolata si inocula in serie in un secondo rospo e in un coniglio, per veder cioè se si fosse attenuata di fronte a un animale a sangue caldo, come di fronte a un animale della stessa specie.

Il reperto necroscopico del coniglio inoculato con la *viridis* passata già attraverso il corpo del rospo, merita d'essere riportato:

Il coniglio muore in 10ª giornata dall'inoculazione, che fu fatta in addome, e presenta numerosissimi tubercoli al peritoneo parietale e viscerale e all'omento, che si presenta inspessito ed iperemico ed aderente a tutti i visceri addominali.

Fra parete anteriore dello stomaco e posteriore dell'ala sinistra del fegato vi è un ascesso grande quanto una nocciola, con pus liquido diffluente, lattescente; milza ingrossata, arrossata, con due piccoli noduli superficiali, reni cosparsi di piccoli noduletti. Ai polmoni si trovano magnifici tubercoli caseificati e infiltrazione agli apici.

Dai noduli e dal pus si riottiene la *viridis*, la quale se si dovesse tener conto della durata della malattia sperimentale e della imponenza delle manifestazioni anatomo–patologiche, parrebbe avesse esaltata la sua virulenza, nel passaggio dall'animale a sangue freddo al mammifero.

L'inoculazione nel secondo rospo non diede manifestazioni anatomo–patologiche molto appariscenti e riinoculata in una terza rana che fu uccisa in 40ª giornata dall'inoculazione in addome, diede reperto negativo.

Questo fatto tenderebbe a dimostrare una attenuazione della *streptothrix viridis*, nelle inoculazioni in serie negli animali a sangue freddo.

Gli stessi fatti, press'a poco, si riscontrano per la *streptothrix Eppinger*, la quale ha un potere patogeno meno manifesto.

Riassumendo, insieme con la formazione dei caratteristici noduli si riscontrano fatti d'infiammazione essudativa, con produzione di aderenze, ecc.

Rospo Lombardo II. — Inoculato sotto cute con il mio acidoresistente due, muore in 67ª giornata, e presenta alla necroscopia tre splendidi tubercoli grigio-perlacei al polmone destro, grossi, al massimo, quanto una capocchia di spillo, gli altri due grossi molto meno, e qualcuno piccolissimo, appena visibile, al polmone sinistro. Questi nodi spiccano nettamente sulla superficie polmonale, e attorno ad essi non notasi zona reattiva: non vi sono aderenze, nè liquido di essudazione nelle cavità rivestite di sierosa; la milza è alquanto arrossata, ma non presenta lesioni molto appariscenti.

Fatti preparati per strisciamento di uno di questi noduli, e colorati con metodo Ziehl-Gabbet, si ha risultato negativo, come pure le culture furono negative.

Uno di questi noduli emulsionato in poca acqua è inoculato in addome in un coniglio, con risultato negativo.

In questo reperto necroscopico, adunque, altra nota anatomica rilevante non c'è, che i noduli tubercolari, ubicati nel polmone.

Lo stesso reperto, press'a poco, mi dà il rospo inoculato col mio acidoresistente I, e ucciso 80 giorni dall'inoculazione, non presentando che un unico nodulo perlaceo sulla superficie anteriore del polmone sinistro e uno alla milza che è alquanto ingrossata e molto arrossata: anche qui il reperto bacteriologico fu negativo; non si tentò la inoculazione di uno dei due noduli in altro animale, perchè si vollero riservare per l'esame istologico.

Lo stesso reperto si ebbe per il rospo inoculato sottocute con l'acidoresistente Tobler II, ucciso in 81ª giornata e che presentava simmetricamente gli apici polmonali infiltrati, con tubercolo apicale caseificato: anche qui reperto bacteriologico negativo.

Lo stesso per il rospo inoculato sottocute con il Tobler IV, ucciso in 50ª giornata, che presenta splendidi noduli al fegato, nulla ai polmoni. Qui la prova bacteriologica riuscì positiva e potei avere il bacillo Tobler IV, di aspetto culturale molto simile all'originario, ma all'esame microscopico mostrò forme piccolissime resistenti in toto agli acidi. Però fatti passaggi in serie, già al terzo passaggio non attecchì, e l'inoculazione in un animale a sangue caldo non diede che un piccolissimo ascesso locale (sottocute) in cui non fu possibile trovare bacilli.

Evidentemente la permanenza nell'animale a sangue freddo aveva diminuita la resistenza vitale del germe, e aveva attenuato il suo potere patogeno.

Reperto analogo, con noduli più o meno numerosi ai polmoni o al fegato, più raramente alla sierosa parietale o viscerale, lo diedero gli acidi resistenti Lombardo IV, VI e VII; il Tobler I, III e V, e il Timotheo bacillo di Moeller — tutti inoculati sotto cute — nessuno morto spontaneamente, ma ucciso in 70ª-90ª giornata: tutti con reperto bacteriologico negativo.

Questo tipo di infezione sperimentale, mi pare si scosti un poco dal tipo dato dalle *streptothrix*, per il lento decorso, per l'assenza assoluta di ogni stimmate d'infiammazione essudativa, per la scarsa patogenecità del germe infettante, che, salvo il caso del Tobler IV, non mi è stato possibile mai più riottenere.

Un fatto è notevole, perchè contraddirebbe ad una delle conclusioni del Lubarsch, su riportate, che cioè al sito d'inoculazione sotto la cute del dorso, non notai mai alcuna lesione che potesse, per così dire, rappresentare il focolaio primitivo d'infezione o ricordare comunque la porta d'entrata: e ciò in nessuno dei numerosi rospi e delle molte rane inoculati.

Più frequentemente invece ho riscontrato le lesioni prodotte dalla localizzazione del germe inoculato, sui polmoni, ma non saprei dare la ragione di questa accertata predilezione.

Dal punto di vista bacteriologico ho potuto per la *streptothrix* accertare modificazioni morfologiche importanti.

Uccisi una lucertola inoculata in addome con la *streptothrix viridis* in 6ª giornata dall'inoculazione. Nei preparati fatti direttamente per strisciamento da uno dei noduli che si trovavano in discreto numero, la *streptothrix* era riconoscibile nella sua forma, ma con alcuni tratti ingrossati e con numerose ramificazioni terminanti a clava: nel preparato si notano inoltre molti granuli rotondeggianti, resistenti agli acidi, che bisogna interpretare come *detritus* proveniente dal disfacimento dei microrganismi.

Fatte culture dai noduli e dal succo degli organi (fegato, milza, polmoni), i risultati furono positivi, e i caratteri culturali non mostrarono nulla di speciale.

Saggiata la resistenza vitale e il potere patogeno, non avvertii alcuna apprezzabile minorazione.

Uccisa una 2ª lucertola inoculata in addome con *streptothrix viridis*, in 20ª giornata, e fatti preparati dai noduli, non si rileva un aspetto microscopico sostanzialmente diverso dal già descritto, solo che i filamenti della *streptothrix* non sono molto lunghi, anzi appaiono spezzettati e il protoplasma appare decolorato in qualche tratto, mentre più abbondanti sono i granuli liberi acidoresistenti.

Fatte culture dai noduli, riuscirono positive, mentre quelle degli organi furono negative. L'aspetto culturale non presenta differenze notevoli; la vegetazione è lussureggiante e il potere patogeno conservato.

Uccisa una 3ª lucertola, inoculata del pari in addome con la *viridis*, in 40ª giornata; la *streptothrix* si presenta con filamenti molto corti e con cortissime e rade ramificazioni terminanti a clava. Però in cultura ripiglia il suo aspetto, e saggiato il potere patogeno in un animale a sangue caldo, non si mostra diminuito.

Gli stessi fatti notai per la *streptothrix* Eppinger, inoculata in addome alle lucertole, e saggiata parallelamente alla *viridis*. Semplicemente il tono del pigmento era nelle culture più pallido.

Quanto ai bacilli pseudotubercolari, già avvertii che il solo reperto bacteriologico positivo me lo diede il Tobler IV, il quale si presenta morfologicamente con aspetto di piccoli bacilli corti, con un'estremità più ingrossata, avvicinandosi molto per la forma al bacillo della difterite di aspetto cocciforme, resistente agli acidi.

L'aspetto culturale è simile al tipico, solo che il pigmento è più pallido e lo sviluppo non è molto rigoglioso, e già al terzo passaggio nei comuni terreni, non si è sviluppato. Il potere patogeno sembra attenuato.

***

Dal punto di vista delle alterazioni anatomo-patologiche ed istopatologiche, già ho esposto le principali lesioni macroscopiche, che si riscontrano, cioè: presenza di piccoli noduli grigio-perlacei, più o meno numerosi, raramente modificati in piccoli ascessi, circoscritti e ben delimitati; di varia grossezza, da una punta di spillo ad un cece, talora un nodulo unico, talora numerosissimi come una tipica tubercolosi miliare; la sede di tali globuli più frequentemente è il polmone, poi il peritoneo, il fegato, i reni; nella milza non se ne riscontrano.

Nelle infezioni da *streptothrix*, tali formazioni nodulari sono sempre accompagnate da fenomeni di infiammazione essudativa, con presenza più o meno abbondante di essudato fibrinoso, aderenze fra i visceri più o meno fitte, iperemie degli organi. In questi casi gli organi partecipano alla infezione sperimentale, con un quadro fenomenologico più evidente, mentre nelle infezioni da acidoresistenti le alterazioni degli organi non sono così manifeste. Si osservano: iperemie ed infiltrazioni ai polmoni; fegato in un caso soltanto (Tobler III) con evidente degenerazione adiposa; milza quasi sempre arrossata, ingrossata, con consistenza diminuita e follicoli linfatici appariscenti; reni di aspetto normale, talora anzi alquanto più pallidi.

L'aspetto istologico dei noduli non si discosta dal tipo dei granulomi, nè differisce molto dall'aspetto che infezioni omologhe determinano negli animali a sangue caldo.

Ma la divisione scolastica dei tubercolomi che apprendiamo dalla patologia generale è in certo modo applicabile per il tubercolo prevalentemente *linfoide* alla paratubercolosi da *streptotrix*, per il tubercolo prevalentemente *epitelioide* alle paratubercolosi da bacilli acidoresistenti.

E questa prevalenza o meno dei linfociti, bisogna metterla in rapporto alla virulenza dello stimolo, al decorso della malattia sperimentale, alla massa di bacilli iniettati.

Le fasi del granuloma sono analoghe, solo che la necrobiosi pare s'inizii un po' più rapidamente nelle streptothricosi, e più facilmente si ha formazione di ascessi, mentre che i noduli prodotti da acidoresistenti hanno tendenza a cicatrizzare (fig. 3).

Nel tubercolo degli animali a sangue freddo si riscontrano: cellule giganti, con nuclei numerosi, i quali talora sono disposti perifericamente a corona, più spesso irregolarmente ammassati al centro; frequente è pure la presenza di grosse cellule epitelioidi con due-quattro o più nuclei, ammassati al centro o a un punto della periferia, di forma alquanto allungata e protoplasma finamente granuloso, le quali cellule si avvicinano alle cellule giganti, anzi dànno l'idea di *atipiche cellule giganti*, nate dalla fusione di due o più cellule epitelioidi.

La cellula gigante è sempre il centro del nodulo tubercolare giovane; invecchiando, il centro è occupato da residui amorfi di necrobiosi. Le cellule giganti si vedono allora respinte verso la periferia del nodulo circondate irregolarmente da cellule epitelioidi, e dalla zona dei linfociti talora limitata, talora invadente irregolarmente il tubercolo.

Nell'interno della cellula gigante non mi è stato dato mai di vedere bacilli. Il macroscopico nodulo perlaceo su descritto non è spesso che l'aggregato di diversi focolai tubercolari, spesso in fase cicatriziale, sicchè è costituito da tanti piccoli tubercolomi riuniti insieme, formanti un nodulo più grande, limitato da una zona di tessuto connettivo, nella quale decorrono i vasi sanguigni.

Negli organi nulla di notevole nelle infezioni da bacilli acidoresistenti, meno che una ipertrofia dei follicoli linfatici della milza.

Nelle infezioni da *streptothrix* notasi nel parenchima epatico sviluppo di piccoli tubercoli tipici e tutto attorno una zona di cellule epatiche, parte conservate, parte deformate.

Nella milza numerose cellule linfoidi, ai reni iperemia, ai polmoni, attorno a ogni vaso sanguigno presenza di numerosi linfociti, infiltrantisi nel parenchima polmonale. Al cuore, ai testicoli e alle ovaie nulla.

Conclusioni.

1° Le *streptothrix* e i bacilli acidoresistenti sono patogeni per gli animali a sangue freddo. Ma il potere patogeno non è uguale per le *streptothrix*, e gli acido resistenti sperimentati, pur essendo in rapporto alla patogenicità che questi germi hanno naturalmente in coltura. Le *streptothrix* infatti uccidono i rospi in 20ª-40ª giornata e solo se si inietta piccolissima quantità di materiale gli animali sopravvivono, fino almeno alla 80ª giornata.

Gli acidoresistenti hanno incomparabilmente un potere patogeno minore, e meno dei rospi Lombardo II, Lombardo VII e Timotheo bacillo, morti spontaneamente, tutti gli altri rospi sarebbero sopravissuti, portandosi apparentemente molto bene le lesioni che avevano. Io uccisi dei rospi sin dopo 100 giorni dall'inoculazione e in vita erano vivaci, e alla necroscopia all'infuori di qualche nodulo grigio-perlaceo non trovai altro. Quindi con gli acidoresistenti non si ha che raramente una diffusione della malattia, ma semplicemente localizzazione negli organi del germe inoculato, compatibili, apparentemente, con la vita dell'animale.

2° Le *streptothrix* nel passaggio attraverso a un animale a sangue freddo, non pare si siano attenuate rispetto a un animale a sangue caldo, mentre che in serie, in animali a sangue freddo, presto si attenuano sensibilmente. Gli acidoresistenti, invece, pare che vegetino male in animali a sangue freddo, e subiscono una sensibile attenuazione. La ragione di questo fatto sarà forse una di quelle indicate da Herzog, pel bacillo della tubercolosi.

Intorno alle proprietà vaccinanti sia per germi similari, che per il bacillo di Koch, riferirò in un successivo lavoro, per ora posso dire soltanto che gli acidoresistenti e le *streptothrix* passati attraverso un organismo a sangue freddo, non assumono proprietà vaccinanti per germi similari.

3° Le alterazioni istopatologiche che si riscontrano nella pseudotubercolosi degli animali a sangue freddo, non si scostano dal tipo dei granulomi, e sono analoghe ai granulomi prodotti nei mammiferi dagli stessi germi.

Luglio 1906.

BIBLIOGRAFIA.

1. Lubarsch. Centralb. f. Bakt., parte I, vol. XXVIII, anno 1900, n. 14-15.
2. Friedmann. Zeitschrift f. Tuberkulose und Heilstättenwesen, vol. IV, fasc. 5, anno 1903.
Id. Centralblatt f. Bakt., vol. 34, parte I, pag. 647, anno 1903.
Id. Deutsche med. Wochenschrift, n. 5, anno 1904.
3. Herzog. Centr. f. Bakt., parte I, vol. 31, anno 1902, pag. 78.
Id. Ibidem, vol. 34, p. I, pag. 675, anno 1903.
4. Moeller. Zeitschrift f. Tuberkolose und Heilstättenwesen, vol. 5, anno 1904.
5. Bertarelli. Estratto dall'Archivio per le scienze mediche, vol. XXIX, anno 1905.
6. Libbert e Ruppel. Deutsche med. Wochensch., n. 4-5, anno 1905.
7. Lombardo Pellegrino. Questi Annali, pag. 533, anno 1904.
8. Sanfelice. Centralb. f. Bakt., giugno 1904.
9. Fuchs. Centralb. f. Bakt., vol. 33, pag. 649, anno 1903.
10. Lombardo Pellegrino. Questi Annali, anno 1906, fasc. II.
11. Rupprecht. Hyg. Rundschau, anno XVI, n. 2, pag. 61, 15 genn. 1906.

SPIEGAZIONE DELLE FIGURE DELLA TAV. XI.

Fig. I. — Nodulo polmonale di pseudotubercolosi da acidoresistente Tobler IV, in cui si vedono tutti gli elementi del granuloma tipico, con una zona centrale necrotica. Corrisponde alla sezione mediana del nodulo pseudotubercolare. Colorato con safranina. Oc. 3, Ob. 6 Koristka.

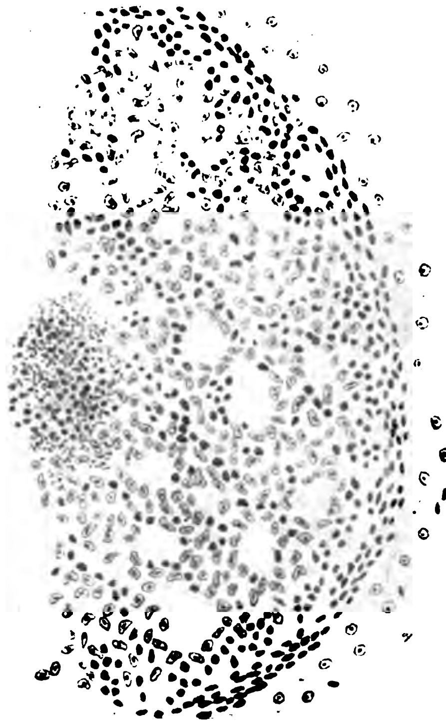
Fig. II. — Nodo di pseudotubercolosi di acidoresistente Lombardo IV, nella spessezza del parenchima epatico. È di aspetto non molto tipico, in cui si si notano le cellule giganti atipiche. Colorato con ematossilina. Oc. 3 Ob. 6 Koristka.

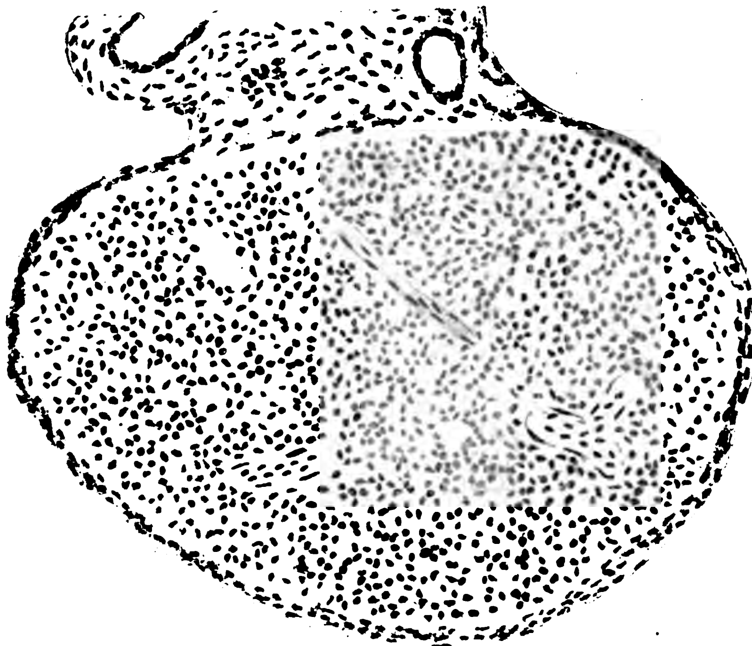
Fig. III. — Nodulo di pseudotubercolosi da Timotheo bacillo, in fase cicatriziale. Col. con ematossilina. Oc. 3, Ob. 6 Kor.

Annali d' Igiene sperimentale,
Vol. XVII (1907), Tav. XI.

Dott. P. LOMBARDO PELLEGRINO.
Sulla pseudotubercolosi negli animali a sangue freddo.


Fig. 1.


Fig. 2.


Fig. 3.

ISTITUTO D'IGIENE DELLA R. UNIVERSITÀ DI PADOVA

La stampa quotidiana e periodica italiana dal punto di vista dell'igiene dell'occhio

per il dott. **ALBERTO GRAZIANI**, aiuto.

Attraverso ad una infinita varietà di tipi e di caratteri, la stampa ha oggidì raggiunto un grado di perfezione, che può rispondere alle maggiori esigenze di praticità, d'arte e d'igiene. Purtroppo però la questione economica, imponendosi, come al solito, a danno dell'estetica e dell'igiene, limita di molto i vantaggi arrecati dal perfezionarsi di quest'arte, per cui raramente si possono risentire i benefici effetti del suo evolversi.

Infatti l'economia di carta limita la grandezza delle lettere, la loro larghezza, lo spessore delle loro aste, costringe lettere, parole, righe nel più breve spazio possibile, riducendo al minimo la distanza tra lettera e lettera, parola e parola, riga e riga. Inoltre il risparmio di spesa induce ad adoperare carta di pessima qualità, ricca di fibre legnose grossolane, non satinata, assorbente.

E poichè le ragioni di economia facilmente prevalgono, vengono ad essere assai spesso trascurati quei vantaggi che largo contributo di studi attribuisce alla stampa curata secondo le norme che l'igiene ha ricavato dalla conoscenza della fisiologia dell'occhio.

È ben noto infatti che i caratteri a stampa troppo piccoli sono nocivi alla vista, in quanto che per distinguerli si devono tenere gli stampati a breve distanza dall'occhio, il che determina un notevole sforzo di accomodazione. Tale sforzo nei giovani è una delle cause più frequenti della miopia, poichè in essi l'occhio è ancora in via di sviluppo; mentre negli adulti può solo cagionare stanchezza eccessiva e consecutiva debolezza visiva.

I difetti però di una cattiva stampa possono non essere in dipendenza soltanto della grandezza dei caratteri. Vi sono anzi molte

altre circostanze che possono avervi una diretta infuenza e delle quali bisogna tener conto.

In pratica non è soltanto al fattore economico che si deve la mancata osservazione dei precetti igienici relativi ad una buona stampa; ma molto spesso, purtroppo, è per ignoranza o per trascuratezza che non viene tenuto di essi il debito conto. E questa ignoranza e trascuratezza non hanno nemmeno a possibile giustificazione eventuali divergenze fra i diversi autori che si occupano di questo argomento; giacchè attualmente è generale l'accordo fra di essi, accordo che si è concretato nel formulare alcune norme, che hanno acquistato il valore di legge.

È perciò che io mi limiterò a riassumere brevemente, senza discuterli, i precetti che si devono seguire nella scelta della carta, dei caratteri e della loro disposizione; estendendo invece le mie ricerche a riscontrare in quali condizioni rispetto ad essi si trovi la stampa periodica italiana.

Un lavoro di questo genere già venne fatto per parte della stampa russa e francese dal Eliasberg (1) col metodo di Cohn, e precisamente sopra 35 giornali russi e 53 francesi. Tale lavoro portò il suo autore a pessimistiche conclusioni sulla stampa che egli aveva esaminata.

In Italia esistono molti lavori che studiano la nostra stampa dal punto di vista storico, economico, sociale; ottimo sotto ogni rapporto quello del Bernardini (2); ricco di dati recentissimi quello di Orazio Buonvino (3). Troppo vecchio invece per poterne tener conto all'infuori dell'interesse storico è lo studio di Ottino (4), il quale considera la stampa italiana anche dal punto di vista tipografico.

Nessuno ha quindi finora esaminate le condizioni della stampa quotidiana e periodica odierna italiana in rapporto specialmente alle attuali esigenze dell'igiene, sicchè mi parve non inutile opera il farlo.

Mia prima intenzione era però di occuparmi esclusivamente dei testi di scuola, i quali, venendo ad essere adoperati da individui giovani e quindi facilmente capaci di diventar miopi, hanno la

---

(1) ELIASBERG. *Druck der Schulbücher*. Wochenschr. f. Theraphie u. Hyg. d. Auges. 1905.

(2) BERNARDINI. *Guida della stampa periodica italiana*. — Lecce, 1890.

(3) BUONVINO O. *Il giornalismo contemporaneo*. — Remo Sandron, editore. Milano, 1906.

(4) OTTINO. *La stampa periodica, il commercio dei libri e la tipografia in Italia*. — Milano, 1875.

maggiore importanza dal punto di vista dell'igiene dell'occhio. Mi rivolsi a tal uopo agli editori principali di tali libri, ed ai provveditori scolastici delle diverse provincie d'Italia. Dei primi pochissimi risposero al mio appello, e quei pochi mi inviarono qualche esemplare fra i migliori delle loro edizioni; dei secondi molti non compresero il significato del mio invito o comprendendolo si dichiararono nella impossibilità di aiutarmi; la maggior parte non rispose nemmeno.

Dovetti quindi limitare la primitiva intenzione, portando le mie ricerche solo sulla stampa periodica, rappresentata dai principali giornali delle maggiori città italiane.

Sono circa 2400 i giornali in genere che si stampano in Italia, di cui poco più di 300 quotidiani. Di questi circa un centinaio hanno notevole importanza per il numero dei lettori e per la loro diffusione e si stampano nelle grandi città; gli altri, e cioè quelli di importanza minore e quelli delle piccole città, hanno per il mio scopo un interesse secondario, sia perchè, come è noto, per la deficienza di materia sono in genere stampati a caratteri grandi, con abbondanti spazieggiature, sia perchè è relativamente esiguo il numero dei loro lettori.

***

Fra gli autori che maggiormente e con più competenza si occuparono dell'igiene della vista in rapporto alla stampa, si deve certamente ricordare il Cohn (1); da un suo lavoro generale sulla stampa, trassi la maggior parte delle norme seguenti, che completai poscia con la raccolta di altre di diversi autori:

1. L'altezza delle lettere minuscole, rilevata misurando la prima gamba dell'*n*, non deve essere inferiore a mm. 1.5;

2. Lo spessore astale misurato sulla stessa gamba dell'*n* deve corrispondere ad un quinto dell'altezza, od al minimo non essere inferiore a mm. 0.25;

3. Lo spazio tra lettera e lettera non deve essere inferiore a mm. 0.5, nè deve in alcun caso essere inferiore alla distanza fra le due gambe dell'*n*;

4. In una riga di 100 mm. non devono trovarsi più di 60 lettere;

---

(1) COHN. *Wie sollen Bücher und Zeitungen gedruckt werden?* Braunschweig, 1903.

5. In un cmq. di stampa non ci devono essere più di 15 lettere;

6. Lo spazio tra riga e riga od interlinea deve essere di mm. 2.5-3, in modo che esso sia eguale a 1.75-2 volte l'altezza delle lettere piccole;

7. Il numero delle righe in un cm. non deve essere maggiore di 2;

8. Il rapporto tra l'interlinea e la lunghezza del rigo non deve essere inferiore a 2.5%;

9. Lo spazio tra parola e parola non deve essere inferiore a mm. 1.5;

10. Ad 1 m. di distanza devono essere riconoscibili le lettere in ogni particolarità;

11. La lunghezza delle righe non deve essere superiore ai 100 mm., nè inferiore ai 30 mm.

Relativamente alla carta si danno le seguenti regole:

1. La grossezza della carta non deve essere inferiore a millimetri 0.075;

2. Il colore della carta è bene sia perfettamente bianco piuttosto che giallognolo o grigio;

3. La carta non deve essere trasparente;

4. La carta deve essere satinata, non lucida e non ombreggiata;

5. Non deve contenere altre fibre vegetali che lino e canapa. La mescolanza con paglia o legno è sempre dannosa.

Ho riassunto così brevemente le norme principali che devono regolare la grandezza e la forma dei caratteri, lo spazieggiamento, l'interlinea e la qualità della carta, perchè io non mi limitai nelle mie ricerche, come fece il Cohn per primo, e dopo di lui gli altri ricercatori che seguirono il suo metodo, a dichiarare mal stampati quei giornali nei quali si trovassero più di 2 righe per cm.

Questo metodo, che può essere buonissimo nella pratica, non si prestava al caso mio, volendo io esaminare più dettagliatamente le condizioni della stampa, che prendevo in considerazione. È vero che in genere quando ci sono più di 2 righe in 1 cm., ciò significa che o l'altezza dei caratteri o quella dell'interlinea sono insufficienti, ma si possono d'altra parte avere degli stampati in cui pur non essendoci più di 2 righe in 1 cm., non sieno osservati gli altri necessari rapporti.

Mi piacque perciò rilevare tutti i dati relativi ai caratteri esaminati, per poter mettere in evidenza quali altri errori, oltre alla

grandezza delle lettere e dell'interlinea, ci sieno nella stampa dei giornali quotidiani e periodici oggidì così importanti e diffusi.

Mi si presentò però una grande difficoltà, consistente nella impossibilità di poter ben determinare a quale dei diversi tipi conosciuti appartenesse questo o quel carattere. I tipografi, è vero, hanno una misura per i caratteri che si chiama corpo, la quale si valuta in punti; ma il punto è una unità varia, così che caratteri della stessa forza di corpo non si corrispondono realmente nelle loro dimensioni.

I diversi nomi speciali, coi quali si designano i caratteri, non rappresentano quindi sempre caratteri della medesima grandezza e disposizione; e il variare delle diverse proporzioni in diversi caratteri che pur appartengono ad uno stesso tipo ne può modificare moltissimo la leggibilità. Perciò abbandonai completamente l'idea di servirmi delle classificazioni dei caratteri in uso presso i tipografi, il che avrebbe semplificato di molto il mio lavoro, e, seguendo il sistema adottato da Ovio (1), conformemente anche al consiglio di persona espertissima nell'arte della stampa, ritenni opportuno usare la misurazione in millimetri assoggettandoni quindi ad un lungo e non facile compito, il quale però mi offeriva in compenso la massima esattezza.

Essendomi procurato i principali giornali quotidiani delle maggiori città italiane, i principali giornali letterari illustrati, ed alcuni giornali d'igiene, presi in esame soltanto quei caratteri di essi che occupavano una parte piuttosto ragguardevole della superficie stampata del giornale stesso, trascurando tutti i caratteri riferentisi a scritti di indole commerciale o di *réclame*, o quelli che non occupavano che una piccolissima parte del giornale stesso.

Prima mia cura era di stabilire in quale rapporto si trovasse rispetto a tutta la superficie stampata del giornale il carattere che veniva da me preso in estame, giacchè, corrispondesse esso o no alle esigenze di una buona stampa, era questo un calcolo di fondamentale importanza. Passavo quindi al rilievo delle sue dimensioni, per il quale mi servii del microscopio munito dell'oculare micrometrico. Questo metodo in confronto di tutti gli altri che avevo escogitati ed esperimentati mi forniva senza dubbio i risultati più esatti. Con i dati, infatti, così raccolti ero in miglior grado di stabilire i rapporti che abbiamo visto esser necessario conoscere per giudicare

(1) Ovio. *I libri a stampa rispetto all'igiene dell'occhio*, 1893.

di uno scritto a stampa. La grossezza della carta veniva da me determinata mediante un esattissimo compasso di spessore; ed il suo contenuto in legno mediante la reazione usata da Cohn. Tale reazione consiste nel bagnare la carta in esame con una soluzione acquosa molto diluita di solfato di anilina; la carta contenente legno si tinge in un colore giallo più intenso, quanto maggiore è il contenuto legnoso. Tale metodo quindi, oltre che ad una ricerca qualitativa, si presta bene anche per una ricerca grossolanamente quantitativa.

Nelle tavole che si trovano in fine di questo lavoro espongo i dati che ho rilevati. Dall'esame di essi si possono trarre le conclusioni sia particolari per ogni giornale, sia generali per la nostra stampa quotidiana e periodica, le quali dai dati stessi vengono ad essere chiaramente indicate.

Come però dalle tavole stesse si può rilevare, di ciascun giornale io presi in considerazione un solo numero, sicchè le proporzioni da me riscontrate dello spazio occupato in essi da ogni carattere esaminato, potrebbero in altri numeri essere alquanto diverse; potrebbe inoltre in questi comparire qualche carattere che in quello da me esaminato non si trovava, o scomparire qualcuno di quelli da me studiati. Siccome però una facile constatazione ci permette di rilevare che in genere ogni giornale, meno casi eccezionali, consacra ad una determinata rubrica presso a poco sempre lo stesso spazio con i medesimi caratteri, così, senza pretendere che i miei dati si riferiscano alla vera media, credo però di poter ritenere che essi sieno relativamente esatti. Oltre a ciò, per la loro natura stessa, queste mie ricerche possono servire soltanto come indice di un determinato momento; esse fissano le condizioni della stampa periodica come essa si presenta allo stato attuale; ma come non sarebbero riferibili a tempi passati, potrebbero tra non molto non corrispondere più al vero stato delle cose, dato che per necessità intrinseche ed estrinseche la stampa periodica va subendo diuturne modificazioni.

***

Ecco ora qualche considerazione particolare ai singoli giornali compresi nei tre gruppi da me studiati: i giornali politici, i letterari illustrati e gli scientifici.

Fra i giornali politici terrò conto soltanto di alcuni fra i principali che essendo letti da centinaia di migliaia di lettori acquistano una importanza generale.

La *Tribuna*, il *Giornale d'Italia*, l'*Avanti!*, l'*Osservatore Romano*,

La Vita, *Il Messaggero*, giornali di Roma, presentano quasi tutti gli inconvenienti che si possono lamentare in una cattiva stampa. Fra essi l'*Avanti!* è per di più stampato su carta troppo sottile, trasparente, leggermente ombreggiata e a contenuto legnoso abbondante.

Il Giorno, il *Mattino*, il *Pungolo*, il *Roma* che sono fra i maggiori giornali di Napoli, e l'*Indipendenza*, il *Guelfo*, giornali della stessa città, sono pur essi tutti mal stampati; mentre *L'Eco del Mezzogiorno*, pur non rispondendo ancora a tutte le buone norme, si avvicinerebbe meglio degli altri ad esse, se non facesse uso di carta troppo sottile.

Il Nuovo Giornale, *Fieramosca*, la *Nazione* di Firenze; *L'Ora* e il *Giornale di Sicilia* di Palermo; *La Sicilia* e il *Giornale di Catania* di Catania; la *Gazzetta di Messina*, la *Scintilla* e l'*Ordine* di Messina, per quanto riguarda i requisiti igienici sono assolutamente deficienti. L'*Ordine* ha un solo carattere che ad essi corrisponderebbe e che occupa il 16 % della superfice totale del giornale; ma la carta su cui è stampato ha uno spessore inferiore al limite minimo voluto.

Fra i più importanti giornali di Milano, L'*Osservatore cattolico*, il *Secolo*, il *Corriere della Sera*, il *Tempo* e la *Sera* non soddisfano, nei riguardi della stampa, alle esigenze della igiene dell'occhio; e lo stesso va detto per i giornali di Bologna, il *Resto del Carlino* e l'*Avvenire d'Italia*, e per quelli di Genova, il *Caffaro*, il *Corriere di Genova*, il *Secolo XIX* e il *Lavoro*.

Così pure i giornali di Torino: *La Stampa*, il *Momento*, l'*Italia reale*, la *Gazzetta del Popolo*; quelli di Venezia: il *Gazzettino*, il *Giornale di Venezia* (ora cessato), l'*Adriatico*, la *Gazzetta di Venezia*; quelli di Padova: *La Libertà*, il *Veneto*, la *Provincia di Padova*; e quelli di Verona: *L'Adige*, l'*Arena* e la *Verona fedele*, e quelli minori di Udine e di Modena e nella altezza e nei diversi rapporti delle lettere, e nell'interlinea e nella qualità della carta non ottemperano certo alle norme riassunte in principio di questo lavoro.

I giornali letterari illustrati che ho esaminato, presentano, quantunque forse un po' meno accentuati, i medesimi difetti dei giornali politici. Mentre in questi il colorito della carta è prevalentemente bianco-grigio, in quelli è assolutamente bianco o con tendenza al giallo. Ora, se non è ancora ben determinato se allo spiccare dei caratteri sul fondo stampato corrisponda meglio la carta grigiastra o la gialliccia, è invece certo che ad esse è preferibile la carta assolutamente bianca, ed è erroneo il credere che il forte contrasto tra il bianco della carta ed il nero dei caratteri possa essere no-

civo all'occhio, quando la carta sia nel tempo stesso senza forti riflessi luminosi. Invece forse per accrescere eleganza allo stampato è facile trovare fra i giornali illustrati la carta lucida. Così l'*Emporium*, *Il Secolo XX* e *L'Illustrazione italiana*, fra i più diffusi, sono stampati su carta lucida, con grave inconveniente per chi legge specialmente a luce artificiale. Su tale carta è pure stampato per metà l'*Ars et Labor*, e di carta leggermente lucida si servono anche la *Lettura* e l'*Avanti della domenica*.

Dei giornali medici ho preso in considerazione quasi esclusivamente i giornali italiani d'igiene che erano a mia disposizione, e dalle mie ricerche risulta pur troppo che anch'essi trascurano le norme di una buona stampa.

Uno dei caratteri usati dagli *Annali d'igiene* si avvicina molto all'*optimum* desiderato, ma il secondo è assolutamente troppo piccolo e ad interlinee deficienti. Per entrambi la lunghezza delle righe è superiore al massimo di 10 cm.

La *Rivista di ingegneria sanitaria* usa anch'essa due caratteri, di questi uno sarebbe ottimo se fosse soltanto pochi decimi di millimetro più alto; l'altro invece è sotto molti aspetti deficiente. La carta usata da essa è inoltre talmente lucida da recare grave molestia ai lettori ed è proprio desiderabile che sia modificata. *L'Avvisatore sanitario*, la *Rivista d'igiene e sanità pubblica*, il *Giornale della R. Società d'igiene* (e specialmente quest'ultimo), per quanto riguarda la grandezza e gli altri rapporti dei caratteri, si presentano prossimi all'*optimum* desiderabile; hanno però le righe di lunghezza superiore ai 10 cm., e la carta a contenuto legnoso molto abbondante. *La Salute pubblica* ed il *Giornale della Società fiorentina d'igiene* si presentano relativamente soddisfacenti alle note regole igieniche, quantunque il primo di essi sia stampato sopra carta di colorito gialliccio, alla quale sarebbe preferibile una carta a colorito perfettamente bianco e, per le sovradette ragioni, non lucida.

***

Passati così in rassegna singolarmente alcuni fra i principali giornali da me studiati, vediamo ora quali conclusioni generali si possano ricavare dall'insieme complessivo dei dati relativi a ciascun giornale.

Risulta da un tale esame che appena in un terzo dei caratteri da me presi in considerazione l'altezza della lettera *n* risponde alla misura fissata. Il rapporto tra spessore astale ed altezza anche in

questo esiguo numero è però rare volte osservato, perchè nella massima parte è inferiore a quanto dovrebbe essere. Ciò per quanto riguarda le dimensioni dei caratteri.

Relativamente allo spazieggiamento le condizioni sono invece alquanto migliori. Lo spazio tra lettera e lettera misurata tra due lettere ad aste verticali (*i* ed *l*, *u* e *n*, ecc.) è raramente inferiore a mm. 0.5; lo spazio tra parola e parola è quasi sempre superiore al limite minimo di mm. 1.5. In tal modo il numero delle lettere per ogni riga di 100 mm., non supera quasi mai la cifra massima di 60.

Dove invece tutti i giornali si mostrano difettosissimi è nell'interlineamento. Appena quattro o cinque caratteri sui 210 da me esaminati erano composti in non più di due righe per centimetro, onde l'interlinea era quasi sempre inferiore al minimo stabilito di mm. 2,2-3; e meno che nei caratteri ad altezza inferiore alla voluta, il rapporto tra altezza dei caratteri ed interlinea era quasi sempre trascurato. Quantunque le righe in genere siano piuttosto corte, il rapporto tra interlinea e lunghezza del rigo era quasi sempre inferiore al minimo fissato di 2.5 per cento. Ne risulta quindi nella maggior parte dei giornali un tale avvicinamento fra le righe per cui in un centimetro di altezza si trova un numero eccessivo di esse; la massima parte dei caratteri da me esaminati presenta appunto più di 3 righe per centimetro, molti più di 3.5, e non pochi più di 4. Deriva da ciò che il numero delle lettere visibili in un cm.² è ben superiore al limite massimo di 15; aggirandosi esso nella maggior parte dei casi intorno a 20, raggiunge però spesso la cifra di 25 e talvolta 30 e più per cm.²

La lunghezza delle righe in media si aggira tra 6 e 7 cm. Tale lunghezza, trattandosi di giornali che sono stampati a più colonne, è convenientissima, in quanto corrisponde alla distanza esistente fra gli assi visivi dei due occhi, per cui le estremità delle righe dànno precisamente la loro immagine nella macula lutea di ciascun occhio, cosa che, oltre rendere possibile la lettura con maggior chiarezza, risparmia i movimenti di abduzione dell'occhio che sarebbero necessari ora per l'uno ed ora per l'altro occhio a seconda che si osserva l'estremità destra o sinistra delle righe. Se le righe fossero più corte, oltre che un movimento di su e giù troppo frequente degli occhi, avremmo di necessità la convergenza degli occhi stessi e quindi la stanchezza dei muscoli oculari.

Per quanto riguarda la carta la massima parte dei giornali è stampata su carta bianco-grigiastra, opaca e in generale non molto

trasparente. Il suo spessore è però quasi sempre inferiore al minimo richiesto, ed il contenuto in legno nella massima parte dei casi è assai abbondante; relativamente rare sono invece le ombreggiature sicchè la carta apparisce relativamente satinata.

Tra una colonna e l'altra dei giornali esiste uno spazio, nel quale nella massima parte dei giornali trovasi una linea nera, che divide le varie colonne in tutta la loro lunghezza. Questo spazio, per rendere ben netta la separazione tra colonna e colonna dovrebbe essere almeno di 4 mm., nel qual caso la demarcazione riuscirà più evidente se in esso non sarà tracciata la linea nera verticale. Nella grandissima parte dei giornali da me esaminati questo spazio non è sufficientemente ampio e perciò si rende necessaria la presenza di questa linea limite, che altrimenti sarebbe meglio sopprimere.

***

Da queste considerazioni generali per quanto riassuntive, appare tosto che la stampa dei giornali quotidiani e periodici italiani si trova in tristissime condizioni riguardo all'igiene dell'occhio. Non è tanto deficiente la grandezza dei caratteri quanto invece è trascurato il rapporto dell'altezza con lo spessore astale e con l'interlinea. È sopra tutto appunto questo che è insufficiente, mentre lo spazieggiamento è, nella massima parte dei casi, superiore alla misura voluta.

La carta dei giornali è quasi sempre troppo sottile, e se i metodi di cilindratura odierni hanno quasi soppresso le ombreggiature, l'aggiunta di una eccessiva quantità di sostanza legnosa alla carta stessa impedisce ai caratteri di bene imprimersi in tutta la loro superficie. A questo si deve aggiungere che una gran parte dei caratteri usati per i giornali è logora, così che osservando, come io facevo, la stampa al microscopio o anche semplicemente con una forte lente d'ingrandimento, si può osservare nello stampato una quantità di spezzettamenti, di lacune, di sfumature, che non tornano certo a vantaggio della sua chiarezza.

È vero che i giornali, sia perchè nel leggerli non è necessario un contemporaneo intenso sforzo di attenzione per comprenderne il contenuto, come invece si richiede per i libri di scuola, sia perchè vengono in genere letti da adulti, possono essere stampati in modo non del tutto rispondente alle regole di un'ottima stampa; non bisogna però che, come avviene per la stampa quotidiana e periodica italiana, tali regole sieno completamente dimenticate. Si

deve ricordare che oggidì non sono soltanto gli adulti che leggono i giornali e sui quali una cattiva stampa pochissima influenza può esercitare sullo sviluppo della miopia, ma che i giornali vanno ora in mano anche di fanciulli e giovanetti di 14-18 anni, allorchè la miopia può essere ancora determinata da uno sforzo oculare eccessivo.

Avviene così che i giornali possono nuocere alla vista dei fanciulli e dei giovani tanto più in quanto che spesso i giornali vengono letti di sera, alla luce artificiale, non sempre sufficiente.

Siccome sono le cronache, i fatti diversi, gli articoli di coltura che vengono letti in modo speciale dai giovanetti, così appunto queste parti del giornale dovrebbero essere stampate con caratteri più grandi, con maggior spazieggiatura ed interlineatura, che non gli articoli di fondo, i telegrammi, le informazioni politiche, per le quali, per ragione di economia di spazio, si potrebbero usare i caratteri più piccoli, proprio al contrario di quanto oggi comunemente si fa. Giacchè per richiamare l'attenzione ed indicare l'importanza delle rubriche non è necessario ricorrere alla grandezza del carattere; basterebbe che il titolo soltanto fosse stampato a caratteri marcati.

È da augurarsi che, sia sorpassando per quanto è possibile sulla questione dello spazio, sia con una disposizione più razionale dei caratteri a seconda della importanza dei diversi articoli, sia infine con opportune migliorie nei caratteri stessi e nella carta, la stampa quotidiana e periodica italiana abbia a redimersi dalle tristissime condizioni in cui oggidì si trova dal punto di vista dell'igiene dell'occhio, in modo da non nuocere alla vista dei lettori e specialmente di quelli di giovane età, con tanta trascuranza delle regole che devono governarla.

TABELLA I.

	STAMPA									
	Altezza della lettera n in mm.	Spessore astale in mm.	Rapporto % tra spessore astale e altezza	Altezza dell' interlineo in mm.	Numero delle righe per cm.	Rapporto % fra interlineo e altezza delle lettere	Lunghezza delle righe in mm.	Rapporto % fra interlineo e lunghezza delle righe	Numero delle lettere per riga (media di 5 righe)	Numero delle lettere in 100 mm.
Giornali di Roma										
La Vita	1.58	0.33	20	1.33	3.5	84	66	2.0	35.0	54
	1.41	0.25	17	1.33	3.9	94	66	2.0	34.0	51
Il Popolo Romano	1.33	0.25	18	1.67	3.4	125	68	2.4	39.2	57
Il Domani	1.67	0.33	19	2.33	2.5	139	64	3.6	32.0	50
	1.41	0.25	17	1.25	3.8	188	64	1.9	36.6	56
L'Osservatore Romano	1.33	0.25	18	1.58	3.4	118	65	2.4	36.4	56
	1.58	0.18	11	2.17	3.0	137	65	3.2	35.2	54
La Tribuna	1.33	0.25	18	2.00	2.9	150	64	3.1	33.8	52
	1.33	0.25	18	1.50	3.4	112	64	2.3	38.2	59
	1.33	0.16	12	1.16	3.9	87	64	1.8	37.6	58
	1.33	0.25	18	1.83	3.0	137	64	2.8	35.6	55
Il Giornale d'Italia	1.50	0.25	16	1.00	3.7	66	62	1.6	34.8	56
	1.41	0.25	17	1.58	3.0	112	62	2.5	35.0	[illegible]
	1.16	0.16	13	1.50	3.9	129	62	2.4	40.4	65
L'Avanti	1.50	0.25	16	1.67	3.0	111	62	2.6	34.0	54
	1.41	0.25	17	1.50	3.4	106	62	2.4	36.6	58
	1.33	0.30	22	1.16	3.9	87	62	1.8	38.2	61

Spazio fra lettera e lettera in mm.	Rapporto % fra lo spazio fra le gambe di un n e quello fra lettera e lettera	Numero delle lettere in un cm² (media di 5 cm²)	Spazio fra parola e parola in mm.	Proporzione % in cui questo carattere si trova in rapporto alla superficie del giornale	CARTA					
					Grossezza in mm.	Colore	Trasparenza	Contenuto in legno	Lucidità	Ombreggiatura
0.83	73	19.0	2.50	38	0.080	bianco grigio	poco trasp.	mediocre	non lucida	non ombregg.
0.66	100	22.0	2.25	29						
0.66	75	23.6	2.08	77	0.060	»	»	»	»	»
0.66	87	16.4	2.50	8.4	0.070	»	»	»	»	»
0.66	100	21.2	2.25	40						
0.66	75	17.4	2.17	49	0.080	»	opaca	abbond.	»	»
0.75	100	15.0	2.58	12						
0.75	77	16.8	3.08	6	0.075	»	»	mediocre	»	»
0.66	74	21.8	2.50	38						
0.58	118	22.4	2.75	6						
0.58	86	17.6	2.33	5						
0.58	100	23.2	1.75	32	0.075	»	poco trasp.	»	»	poco ombregg.
0.66	87	19.4	2.00	5						
0.83	69	25.4	2.58	10						
0.58	120	17.8	3.17	8	0.060	»	trasp.	abbond.	»	»
0.66	75	19.6	2.17	41						
0.58	86	25.0	2.0	8						

Segue TABELLA I.

	STAMPA									
	Altezza della lettera *n* in mm.	Spessore astale in mm.	Rapporto % tra spessore astale e altezza	Altezza dell' interlineo in mm.	Numero delle righe per cm.	Rapporto % fra interlineo e altezza delle lettere	Lunghezza delle righe in mm.	Rapporto % fra interlineo e lunghezza delle righe	Numero delle lettere per riga (media di 5 righe)	Numero delle lettere in 100 mm.
La Patria	1.41	0.23	16	1.08	3.9	76	63	1.7	36.0	57
	1.50	0.25	16	1.58	3.7	105	63	2.5	34.6	54
L'Italie	1.33	0.25	18	1.83	2.8	137	57	3.2	31.8	55
La Capitale	1.50	0.25	16	1.83	2.9	122	65	2.8	35.2	54
	1.41	0.26	18	1.33	3.4	94	65	2.0	35.4	54
	1.33	0.16	12	1.16	3.8	87	65	1.7	35.8	55
Il Messaggero	1.33	0.25	18	1.67	3.4	125	58	2.8	33.2	57
	1.25	0.25	20	1.33	3.7	106	58	2.2	32.2	55
	1.25	0.20	16	0.91	4.5	72	58	1.5	37.4	64
Giornali di Verona.										
L'Adige	1.41	0.33	23	2.58	2.4	172	67	3.8	36.4	54
	1.50	0.33	22	1.83	3.0	122	67	2.7	37.0	55
L'Arena	1.50	0.25	16	1.83	3.0	122	67	2.7	36.6	54
	1.50	0.25	16	1.41	3.3	94	67	2.1	35.0	52
La Verona Fedele	1.50	0.25	16	1.83	3.0	122	67	2.7	35.0	52
	1.41	0.25	17	1.41	3.3	94	67	2.1	37.8	57

Spazio fra lettera e lettera in mm.	Rapporto % fra lo spazio fra le gambe di un *n* e quello fra lettera e lettera	Numero delle lettere in un cm² (media di 5 cm²)	Spazio fra parola e parola in mm.	Proporzione % in cui questo carattere si trova in rapporto alla superficie del giornale	CARTA Grossezza in mm.	Colore	Trasparenza	Contenuto in legno	Lucidità	Ombreggiatura
0.66	100	22.0	2.67	39	0.060	»	poco trasp.	»	»	non ombregg.
0.75	85	20.2	2.25	7						
0.83	67	15.6	2.08	56	0.070	»	»	»	»	»
0.66	100	16.2	2.23	5	0.070	»	»	»	»	»
0.75	88	17.4	2.17	32						
0.83	80	20.6	2.67	16						
.66	80	19.0	2.83	7	0.080	»	opaca	»	»	»
.75	66	22.2	2.25	36						
.58	86	32.0	2.33	18						
.66	71	17.6	3.00	20	0.080	bianco	opaca	mediocre	non lucida	non ombregg.
.66	87	16.4	2.00	42						
.66	88	18.0	2.83	36	0.080	bianco grigio	trasp.	abbond.	»	poco ombregg.
.66	75	18.6	2.17	22						
.66	86	16.6	2.42	38	0.070	»	»	»	»	non ombregg.
.66	72	18.0	2.83	12						

TABELLA II.

	STAMPA									
	Altezza della lettera n in mm.	Spessore astale in mm.	Rapporto % tra spessore astale e altezza	Altezza dell' interlineo in mm.	Numero delle righe per cm.	Rapporto % fra interlineo e altezza delle lettere	Lunghezza delle righe in mm.	Rapporto % fra interlineo e lunghezza delle righe	Numero delle lettere per riga (media di 5 righe)	Numero delle lettere in 100 mm.
Giornali di Napoli.										
Roma	1.50	0.20	13	1.75	3.0	116	70	2.5	38.2	54
	1.50	0.25	16	2.08	2.7	108	70	2.9	35.1	50
	1.33	0.25	11	1.58	3.4	118	70	2.2	42.0	60
Indipendenza	1.33	0.25	18	1.41	3.3	106	63	2.3	32.2	51
	1.58	0.33	20	1.67	3.0	105	63	2.6	23.9	37
Il Giorno	1.25	0.25	20	1.25	3.9	100	64	1.9	39.6	61
	1.33	0.33	24	1.50	3.4	112	64	2.3	41.4	64
Il Pungolo	1.33	0.25	18	1.58	3.4	118	58	2.7	35.2	60
Il Mattino	1.25	0.25	20	1.67	3.3	133	62	2.5	33.6	54
	1.25	0.25	20	1.67	3.0	133	62	2.5	32.6	52
	1.16	0.25	21	1.25	3.8	107	62	2.0	40.6	65
La Propaganda	1.41	0.25	17	1.83	3.0	129	71	2.5	40.0	56
	1.33	0.25	18	1.50	3.3	112	71	2.1	45.2	63
Don Marzio	1.41	0.25	17	2.10	2.7	156	61	3.5	33.8	55
	1.41	0.25	17	1.33	3.4	94	61	2.1	34.0	55
Il Piccolo Marittimo	1.67	0.25	14.9	1.83	3.1	109	67	2.7	27.0	40
Il Corriere Vesuviano	1.58	0.25	15	2.08	2.7	131	67	3.1	33.0	49
	1.58	0.33	20	2.10	2.4	132	67	3.1	31.2	46

Spasio fra lettera e lettera in mm.	Rapporto % fra lo spasio fra le gambe di un n e quello fra lettera e lettera	Numero delle lettere in un cm² (media di 5 cm²)	Spasio fra parola e parola in mm.	Proporzione % in cui questo carattere si trova in rapporto alla superficie del giornale	CARTA Grossezza in mm.	Colore	Trasparenza	Contenuto in legno	Lucidità	Ombreggiatura
.75	77	17.2	2.5	35	0.080	bianco grigio	traspa-rente	abbon-dante	non lucida	poco om-breggiata
.83	73	15.2	2.6	6						
.66	75	20.4	2.0	15						
.75	66	19.0	2.1	42	0.080	»	»	mediocre	»	non om-breggiata
.75	74	14.6	2.3	19						
.75	66	24.2	2.5	18	0.040	»	»	»	»	»
.58	100	21.4	2.0	34						
.58	86	21.8	1.7	66	0.050	»	»	abbon-dante	»	»
.66	75	20.2	2.4	21	0.080	»	opaca	»	»	»
.66	100	18.2	2.2	10						
.58	86	25.4	2.5	22						
.66	87	18.0	2.3	28	0.050	»	traspa-rente	»	lucida	»
.58	70	21.0	1.5	36						
.66	75	17.4	2.1	18	0.075	»	poco traspar.	»	non lucida	»
.75	66	25.0	2.0	34						
.66	100	16.2	2.4	30	0.050	»	traspa-rente	»	lucida	»
.75	88	16.8	3.5	36	0.060	»	poco traspar.	mediocre	»	»
.83	60	15.6	2.8	21						

Segue TABELLA II.

	STAMPA									
	Altezza della lettera *n* in mm.	Spessore astale in mm.	Rapporto % fra spessore astale e altezza	Altezza dell' interlineo in mm.	Numero delle righe per cm.	Rapporto % fra interlineo e altezza delle lettere	Lunghezza delle righe in mm.	Rapporto % fra interlineo e lunghezza delle righe	Numero delle lettere per riga (media di 5 righe)	Numero delle lettere in 100 mm.
Il Parlamento Italiano	1.92	0.25	13	2.10	2.3	109	65	3.2	31.4	48
	1.53	0.33	21	2.33	2.4	127	65	3.5	33.4	51
L'Eco del Mezzogiorno	1.67	0.33	18	2.48	2.2	148	70	3.5	35.0	50
Il Guelfo.	1.50	0.28	18	2.00	2.7	133	62	3.2	31.6	50
	1.33	0.28	13	1.75	2.9	131	62	2.8	37.4	60
La Croce.	1.08	0.16	14	1.67	3.3	154	65	2.5	41.4	63
La Follia.	1.83	0.33	18	3.17	1.9	173	65	4.8	25.8	39
	1.58	0.41	25	1.94	2.7	122	67	2.8	33.6	50
Monsignor Perelli . .	1.41	0.28	19	1.83	3.4	129	70	2.6	42.2	60
Giornali di Genova.										
Il Caffaro	1.58	0.20	12	1.67	3.0	105	71	2.3	36.4	51
	1.33	0.25	18	1.41	3.4	106	71	1.9	39.2	55
Il Corriere di Genova	1.41	0.25	17	1.33	3.4	94	72	1.8	38.8	52
Il Secolo XIX	1.50	0.20	13	1.33	3.2	88	61	2.1	35.4	58
Il Lavoro	1.58	0.25	15	1.50	3.0	94	61	2.4	31.2	51
	1.41	0.33	23	1.50	3.3	106	61	2.4	32.8	53
	1.33	0.25	18	1.58	3.3	84	61	2.5	33.0	54
	1.41	0.25	17	1.16	3.8	121	61	1.9	37.2	60

Spazio fra lettera e lettera in mm.	Rapporto % fra lo spazio fra le gambe di un n e quello fra lettera e lettera	Numero delle lettere in un cm² (media di 3 cm²)	Spazio fra parola e parola in mm.	Proporzione % in cui questo carattere si trova in rapporto alla superficie del giornale	CARTA Grossezza in mm.	Colore	Trasparenza	Contenuto in legno	Lucidità	Ombreggiatura
0.75	88	12.2	2.7	19	0.050	bianco grigio	poco traspar.	abbondante	lucida	non ombreggiata
0.66	75	14.6	3.0	21						
0.66	100	13.4	2.4	40	0.060	»	»	»	»	»
0.66	80	16.0	2.7	20	0.050	»	»	»	»	»
0.58	100	17.2	2.0	42						
0.50	100	21.0	1.4	60	0.070	»	»	mediocre	leggermente lucida	»
0.83	100	19.0	3.5	8	0.060	»	»	abbondante	lucida	ombreggiata
0.66	77	14.6	3.3	11						
0.58	100	20.6	2.2	20	0.080	»	opaca	»	non lucida	»
0.83	79	16.8	2.0	23	0.060	»	poco traspar.	mediocre	»	»
0.66	87	18.6	2.4	35						
0.75	77	18.2	2.7	60	0.070	»	traspar.	abbondante	»	»
0.75	66	21.2	2.1	72	0.080	»	opaca	»	»	»
0.75	88	15.8	2.3	10	0.080	»	»	»	»	»
0.66	87	19.2	3.1	20						
0.58	86	20.8	2.7	7						
0.66	87	24.6	2.6	31						

TABELLA III.

	STAMPA									
	Altezza della lettera *n* in mm.	Spessore astale in mm.	Rapporto % tra spessore astale e altezza	Altezza dell'interlineo in mm.	Numero delle righe per cm.	Rapporto % fra interlineo e altezza delle lettere	Lunghezza delle righe in mm.	Rapporto % fra interlineo e lunghezza delle righe	Numero delle lettere per riga (media di 5 righe)	Numero delle lettere in 100 mm.
Giornali di Bologna.										
Il Resto del Carlino	1.67	0.25	15	1.58	3.00	94	67	2.3	37.8	56
	1.50	0.25	16	1.67	3.50	111	67	2.4	35.4	52
	1.33	0.25	18	1.67	3.0	127	67	2.4	39.0	58
La Squilla	1.67	0.28	16	2.92	2.5	174	67	4.3	35.0	52
	1.41	0.28	19	2.25	3.0	159	67	3.3	34.4	51
	1.50	0.33	22	1.92	3.0	128	67	2.8	36.0	53
La Voce della Democrazia	1.67	0.25	15	2.92	2.5	174	67	4.3	33.2	49
	1.50	0.25	16	2.58	2.5	172	67	3.8	39.8	59
Il Popolo	1.78	0.25	14	3.59	2.0	201	67	5.3	27.7	41
	1.58	0.25	15	3.00	2.3	126	67	4.4	32.6	48
L'Avvenire d'Italia	1.53	0.33	21	2.58	3.0	168	67	3.8	41.0	61
	1.50	0.25	16	1.16	4.0	77	67	1.7	38.0	56
	1.50	0.28	18	1.41	4.0	94	67	2.1	33.4	49
Giornali di Milano.										
La Lombardia	1.33	0.20	15	2.42	2.7	181	68	2.6	38.9	51
	1.33	0.21	15	1.67	3.4	125	68	1.7	37.4	55
L'Osservatore Cattolico	1.58	0.28	17	1.41	3.4	89	67	2.1	33.2	49
	1.50	0.25	16	1.16	3.8	77	67	1.7	34.8	51
	1.25	0.20	16	1.41	3.8	112	67	2.1	38.4	57

Spazio fra lettera e lettera in mm.	Rapporto % fra lo spazio fra le gambe di un *n* e quello fra lettera e lettera	Numero delle lettere in un cm² (media di 5 cm²)	Spazio fra parola e parola in mm.	Proporzione % in cui questo carattere si trova in rapporto alla superficie del giornale	CARTA					
					Grossezza in mm.	Colore	Trasparenza	Contenuto in legno	Lucidità	Ombreggiatura
0.83	60	17.2	2.33	11						
0.66	101	18.2	2.83	36	0.060	bianco grigio	traspa-rente	m diocre	non lucida	non om-breggiata
0.66	88	22.0	2.42	20						
0.75	81	13.0	3.34	19						
0.91	73	14.6	2.67	22	0.060	»	poco traspar.	abbon-dante	»	»
0.66	88	17.3	3.17	33						
0.83	86	14.0	3.17	38	0.060	»	opaca	»	»	»
0.75	77	14.0	2.33	15						
0.83	79	9.0	3.59	25	0.050	»	traspa-rente	»	lucida	»
0.91	78	13.0	3.00	50						
0.66	100	16.3	2.58	2						
0.70	94	21.0	2.25	33	0.080	»	opaca	»	non lucida	»
0.70	94	18.0	3.00	25						
0.66	100	17.0	2.42	10	0.070	bianco grigio	opaca	abbon-dante	non lucida	non om-breggiata
0.58	113	19.0	2.58	53						
0.86	81	18.0	2.92	34						
0.66	100	21.4	2.33	24	0.060	»	»	»	»	poco om-breggiata
0.66	75	24.4	2.25	10						

Segue TABELLA III.

	STAMPA									
	Altezza della lettera *n* in mm.	Spessore astale in mm.	Rapporto % tra spessore astale e altezza	Altezza dell' interlineo in mm.	Numero delle righe per cm.	Rapporto % fra interlineo e altezza delle lettere	Lunghezza delle righe in mm.	Rapporto % fra interlineo e lunghezza delle righe	Numero delle lettere per riga (media di 5 righe)	Numero delle lettere in 100 mm.
La Lega Lombarda	1.50	0.26	17	1.58	3.3	105	70	2.2	37.4	53
	1.33	0.23	17	1.16	3.8	87	70	1.6	36.4	52
Il Sole	1.58	0.33	20	1.33	3.3	84	57	2.3	31.2	54
	1.41	0.25	17	1.16	3.9	82	57	2.0	33.8	59
Il Tempo	1.50	0.30	20	1.33	3.3	88	70	1.9	37.3	53
	1.58	0.30	18	2.17	2.7	137	70	3.0	37.2	53
	1.41	0.26	18	1.16	3.9	82	70	1.6	38.2	51
La Sera	1.50	0.30	20	1.33	3.3	88	70	1.9	37.2	53
	1.50	0.33	22	1.16	3.0	77	70	1.6	38.6	55
Gli Sports	1.41	0.33	23	1.33	3.3	94	59	2.2	30.6	51
	1.25	0.21	17	1.33	3.9	106	59	2.2	34.9	57
La Perseveranza	1.50	0.30	20	1.41	3.3	94	63	2.2	31.2	49
Il Corriere della Sera	1.41	0.28	19	2.17	2.8	153	65	3.3	35.0	53
	1.50	0.25	16	1.00	3.9	66	65	1.5	34.0	52
	1.50	0.25	16	1.83	3.2	122	65	2.8	37.0	56
Il Secolo	1.75	0.25	14	1.50	3.0	85	60	2.5	34.6	57
	1.67	0.25	14	1.25	3.4	74	60	2.0	35.8	59
	1.16	0.25	21	1.25	3.7	107	60	2.0	35.0	58

					CARTA					
Spazio fra lettera e lettera in mm.	Rapporto % fra lo spazio fra le gambe di un *n* e quello fra lettera e lettera	Numero delle lettere in un cm² (media di 5 cm²)	Spazio fra parola e parola in mm.	Proporzione % in cui questo carattere si trova in rapporto alla superficie del giornale	Grossezza in mm.	Colore	Trasparenza	Contenuto in legno	Lucidità	Ombreggiatura
0.83	79	22.4	2.50	45	0.060	bianco grigio	opaca	mediocre	non lucida	non ombreggiata
0.70	94	18.6	2.60	10						
0.66	87	17.6	2.30	32	0.050	bianco latte	»	»	poco lucida	poco ombreggiata
0.66	87	21.6	2.00	30						
0.66	100	18.6	2.50	25	0.060	bianco grigio	»	»	non lucida	non ombreggiata
0.75	88	15.4	2.10	25						
0.66	106	23.4	2.90	10						
0.75	77	17.8	2.30	38	0.060	»	poco traspar.	»	»	»
0.66	87	20.5	2.70	28						
0.75	77	17.4	3.30	57	0.080	bianco latte	opaca	abbondante	»	ombreggiata
0.66	75	23.6	2.00	9.7						
0.75	88	18.8	2.58	66	0.080	bianco grigio	»	»	»	»
0.75	88	14.0	2.61	13	0.070	»	»	»	»	»
0.58	113	23.0	1.92	48						
0.75	77	17.0	2.00	7						
0.66	53	18.8	1.83	14	0.060	»	poco traspar.	»	»	»
0.66	62	21.6	1.67	39						
0.75	66	21.0	2.25	15						

TABELLA IV.

	STAMPA									
	Altezza della lettera n in mm.	Spessore astale in mm.	Rapporto % tra spessore astale e altezza	Altezza dell'interlineo in mm.	Numero delle righe per cm.	Rapporto % fra interlineo e altezza delle lettere	Lunghezza delle righe in mm.	Rapporto % fra interlineo e lunghezza delle righe	Numero delle lettere per riga (media di 5 righe)	Numero delle lettere in 100 mm.
Giornali di Torino.										
La Stampa	1.33	0.25	18	1.83	3.0	138	67	2.7	33.4	49
	1.41	0.25	17	2.25	2.6	129	67	3.3	33.2	49
	1.16	0.25	21	1.67	3.4	157	67	2.4	34.6	50
	1.25	0.20	16	1.50	3.4	146	67	2.2	39.0	58
Il Momento	1.33	0.25	18	1.08	3.4	81	65	1.6	36.6	56
	1.08	0.16	14	1.25	4.1	115	65	1.9	41.0	63
Gazzetta di Torino . .	1.33	0.25	18	1.33	3.3	100	69	1.9	35.2	51
Il Grido del Popolo .	1.50	0.25	16	2.00	2.7	133	67	2.9	34.2	51
	1.16	0.16	13	1.67	3.4	143	67	2.4	40.4	60
L'Italia Reale	1.41	0.25	17	2.40	2.5	177	60	4.0	30.0	50
	1.33	0.25	18	1.83	2.9	138	60	3.0	34.6	57
Gazzetta del Popolo .	1.33	0.25	18	1.67	3.0	125	67	2.4	35.4	52
	1.33	0.20	15	1.33	3.3	100	67	1.9	36.0	53
	1.08	0.20	18	1.25	3.8	115	67	1.8	39.2	58
Giornali di Venezia.										
Il Gazzettino.	1.75	0.25	14	1.08	3.4	61	60	1.6	34.2	57
	1.25	0.16	12	1.10	3.8	88	60	1.8	38.2	63
Il Giornale di Venezia	1.41	0.25	17	1.16	2.7	82	62	1.8	32.2	51
	1.41	0.25	17	1.41	3.3	100	62	2.2	35.6	57
	1.16	0.25	21	1.33	3.9	114	62	2.1	36.0	58

Spazio fra lettera e lettera in mm.	Rapporto % fra lo spazio fra le gambe di un n e quello fra lettera e lettera	Nuuero delle lettere in un cm² (media di 5 cm²)	Spazio fra parola e parola in mm.	Proporzione % in cui questo carattere si trova in rapporto alla superficie del giornale	CARTA: Grossezza in mm.	CARTA: Colore	CARTA: Trasparenza	CARTA: Contenuto in legno	CARTA: Lucidità	CARTA: Ombreggiatura
0.66	87	16.8	2.3	20	0.060	bianco grigio	poco trasp.	abbond.	non lucida	non ombregg.
0.66	87	16.4	2.4	12						
0.66	87	19.2	2.1	15						
0.58	86	19.6	2.0	18						
0.66	87	20.0	2.3	37	0.060	»	»	»	»	»
0.66	75	24.2	2.0	14						
0.58	100	18.0	2.4	60	0.060	»	trasp.	»	»	»
0.66	100	17.0	2.4	15	0.050	»	»	»	lucida	»
0.66	87	23.2	2.0	46						
0.66	87	14.2	2.5	13	0.070	»	poco trasp.	»	non lucida	»
0.75	66	18.2	2.1	40						
0.66	87	18.5	2.5	9	0.070	»	opaca	»	»	poco ombregg.
0.58	100	20.1	2.5	30						
0.66	58	23.1	1.5	16						
0.58	70	20.8	1.92	25	0.050	bianco grigio	poco trasp.	mediocre	non lucida	non ombregg.
0.66	70	25.2	2.50	42						
0.75	88	17.0	2.42	7	0.070	bianco latte	»	abbond.	»	poco ombregg.
0.83	79	19.4	2.50	29						
0.66	75	33.4	2.17	20						

Segue TABELLA IV.

	STAMPA									
	Altezza della lettera *n* in mm.	Spessore astale in mm.	Rapporto % tra spessore astale e altezza	Altezza dell'interlineo in mm.	Numero delle righe per cm.	Rapporto % fra interlineo e altezza delle lettere	Lunghezza delle righe in mm.	Rapporto % fra interlineo e lunghezza delle righe	Numero delle lettere per riga (media di 5 righe)	Numero delle lettere in 100 mm.
La Gazzetta di Venezia	1.41	0.25	17	2.17	2.7	153	72	3.0	36.6	50
	1.33	0.25	18	1.50	3.4	112	72	2.0	39.2	54
L'Adriatico	1.41	0.25	17	1.33	3.4	94	60	2.2	30.8	50
	1.33	0.20	15	1.08	3.8	81	60	1.8	33.6	55
Il Giornaletto	1.33	0.25	18	1.41	3.4	106	62	2.2	34.2	55
	1.16	0.25	21	1.33	3.8	114	62	2.1	38.6	62
Giornali di Padova										
La Libertà	1.50	0.33	22	2.33	2.4	155	62	3.7	32.8	52
Il Veneto	1.25	0.25	20	1.67	3.0	133	61	2.7	31.8	52
	1.67	0.25	14	1.75	3.0	104	61	2.8	29.5	48
La Provincia di Padova	1.67	0.33	19	1.85	2.7	110	67	2.7	32.2	48
	1.33	0.25	18	1.50	2.7	120	67	2.2	32.8	48
	1.41	0.33	23	1.67	3.0	111	67	2.4	31.6	47

Spazio fra lettera e lettera in mm.	Rapporto % fra lo spazio fra le gambe di un n e quello fra lettera e lettera	Numero delle lettere in un cm² (media di 5 cm²)	Spazio fra parola e parola in mm.	Proporzione % in cui questo carattere si trova in rapporto alla superficie del giornale	CARTA: Grossezza in mm.	Colore	Trasparenza	Contenuto in legno	Lucidità	Ombreggiatura
0.83	79	16.6	2.75	5	0.080	bianco grigio	opaca	abbon-dante	non lucida	ombregg.
0.75	77	15.1	2.75	64						
0.83	69	17.6	2.30	30	0.080	»	»	mediocre	»	non ombregg.
0.66	100	21.4	1.92	35						
0.58	86	21.4	1.92	37	0.070	»	»	»	»	»
0.58	62	25.4	2.67	27						
0.66	62	15.1	1.85	50	0.070	bianco grigio	poco trasp.	abbond.	non lucida	non ombregg.
0.66	87	16.6	2.30	42	0.080	»	trasp.	»	»	»
0.75	100	14.5	1.50	16						
0.75	88	15.6	2.44	35	0.070	»	opaca	mediocre	»	»
0.58	100	17.0	2.67	12						
0.75	77	16.3	2.83	18						

TABELLA V.

	STAMPA									
	Altezza della lettera *n* in mm.	Spessore astale in mm.	Rapporto % tra spessore astale e altezza	Altezza dell'interlineo in mm.	Numero delle righe per cm.	Rapporto % fra interlineo e altezza delle lettere	Lunghezza delle righe in mm.	Rapporto % fra interlineo e lunghezza delle righe	Numero delle lettere per riga (media di 5 righe)	Numero delle lettere in 100 mm.
Giornali di Messina.										
Gazzetta di Messina .	1.50	0.36	24	1.67	3	111	58	2.9	30.8	53
	1.50	0.41	27	1.50	4	100	58	2.7	35.4	61
	1.67	0.33	19	1.92	3	127	58	3.3	29.2	50
La Scintilla	1.55	0.33	22	1.75	3	112	50	3.5	25.0	50
	1.63	0.33	20	2.50	3	153	50	5.0	25.0	50
	1.41	0.25	18	2.41	3	170	50	4.8	28.8	57
L'Ordine	2.42	0.60	24	2.67	2	110	61	4.3	21.0	34
	1.67	0.33	19	1.92	2.5	116	64	3.0	33.2	51
	1.92	0.36	18	2.58	2.5	134	63	4.0	31.6	50
Germinal	1.50	0.25	16	1.83	3	122	65	2.8	34.4	52
	1.25	0.21	16	1.75	4	140	65	2.6	37.6	57
Giornali di Catania.										
La Sicilia	1.58	0.33	20	1.67	2.9	105	63	2.6	33.0	52
	1.67	0.33	19	1.67	2.7	100	63	2.6	33.6	53
Il Giornale di Catania.	1.33	0.33	24	1.67	3.0	125	67	2.4	34.4	51
Il Risveglio	1.25	0.33	26	2.90	2.2	132	67	4.3	30.4	45
Il Corriere di Catania.	1.67	0.25	14	1.67	2.7	100	60	2.7	30.6	51
	1.50	0.25	16	1.41	3.3	94	60	2.3	32.8	54

Spazio fra lettera e lettera in mm.	Rapporto % fra lo spazio fra le gambe di un *n* e quello fra lettera e lettera	Numero delle lettere in un cm² (media di 5 cm²)	Spazio fra parola e parola in mm.	Proporzione % in cui questo carattere si trova in rapporto alla superficie del giornale	CARTA					
					Grossezza in mm.	Colore	Trasparenza	Contenuto in legno	Lucidità	Ombreggiatura
0.66	72	16	2.33	41						
0.66	72	28	2.17	12	0.070	bianco grigio	non traspar.	abbondante	non lucida	ombreggiato
0.66	88	15	2.58	36						
0.83	79	14	2.58	7						
0.80	78	15.5	2.42	37	0.075	bianco latte	poco traspar.	»	»	non ombreg.
0.58	86	17.6	2.75	14						
1.16	79	7	3.59	16						
0.75	91	11	2.45	18	0.060	bianco grigio	traspar.	»	»	»
0.86	87	12	4.59	13						
0.75	82	15.8	2.33	53	0.060	»	»	»	»	»
0.80	66	23.8	2.25	23						
0.66	79	16	1.67	45	0.080	bianco grigio	poco traspar.	mediocre	non lucida	ombreggiato
0.66	100	16.8	2.50	15						
0.66	75	16.4	2.83	62	0.070	bianco latte	»	abbondante	»	poco ombreg.
0.83	69	12.0	2.50	73	0.060	»	opaca	»	»	»
0.66	75	16.6	2.50	16	0.070	bianco grigio	poco traspar.	»	»	non ombreg.
0.66	96	19.0	1.90	48						

Segue TABELLA V.

	STAMPA									
	Altezza della lettera x in mm.	Spessore astale in mm.	Rapporto % tra spessore astale e altezza	Altezza dell' interlineo in mm.	Numero delle righe per cm.	Rapporto % fra interlineo e altezza delle lettere	Lunghezza delle righe in mm.	Rapporto % fra interlineo o lunghezza delle righe	Numero delle lettere per riga (media di 5 righe)	Numero delle lettere in 100 mm.
Giornali di Palermo.										
L'Ora	1.50	0.25	16	1.83	3.0	122	65	2.8	37	57
	1.33	0.25	18	1.50	3.4	112	65	2.3	34	52
	1.25	0.25	20	1.25	3.9	100	65	1.9	40	61
Il Giornale di Sicilia	1.67	0.33	19	1.58	3.0	93	60	2.6	32	53
	1.33	0.33	24	1.25	3.9	93	60	2.0	38	63
La Battaglia	1.67	0.30	17	1.83	2.7	109	58	3.0	31	53
	1.33	0.20	15	1.92	3.0	144	58	3.3	38	65
	1.33	0.16	12	1.58	3.4	111	58	2.7	34	58
Giornali di Firenze.										
Fieramosca	1.33	0.25	18	1.50	3.4	112	62	2.4	35	56
	1.50	0.25	16	1.83	2.7	122	62	2.9	33	53
Il Nuovo Giornale	1.50	0.25	16	1.50	3.4	100	73	2.0	37	54
	1.41	0.25	17	1.50	3.5	114	73	2.0	39	53
La Nazione	1.41	0.33	23	1.50	3.0	106	62	2.4	34	54
	1.41	0.33	23	1.83	3.3	129	62	2.9	35	56

Spazio fra lettera e lettera in mm.	Rapporto % fra lo spazio fra le gambe di un n e quello fra lettera e lettera	Numero delle lettere in un cm² (media di 5 cm²)	Spazio fra parola e parola in mm.	Proporzione % in cui questo carattere si trova in rapporto alla superficie del giornale	CARTA Grossezza in mm.	Colore	Trasparenza	Contenuto in legno	Lucidità	Ombreggiatura
.10	60	16	2.33	12						
.66	100	21	2.25	18	0.080	bianco grigio	poco traspar.	abbondante	non lucida	poco ombreg.
.58	86	27	2.17	23						
.66	92	16	2.08	11	0.070	»	»	»	»	»
.58	86	20	1.75	48						
.75	100	15	2.58	8						
.75	77	18	3.17	21	0.070	bianco	»	»	»	non ombreg.
.66	87	21	1.92	26						
.75	77	20	2.42	48	0.080	bianco latte	trasparente	abbondante	non lucida	non ombreg.
.75	88	17	2.25	8						
.75	100	18	2.58	29	0.070	bianco grigio	»	»	»	ombreg.
.66	100	18.8	2.08	33						
.58	100	17.2	2.50	3	0.080	»	non traspar.	»	»	»
.50	98	19.4	2.50	56						

TABELLA VI.

	STAMPA									
	Altezza della lettera *n* in mm.	Spessore astale in mm.	Rapporto % tra spessore astale e altezza	Altezza dell' interlineo in mm.	Numero delle righe per cm.	Rapporto % fra interlineo e altezza delle lettere	Lunghezza delle righe in mm.	Rapporto % fra interlineo e lunghezza delle righe	Numero delle lettere per riga (media di 5 righe)	Numero delle lettere in 100 mm.
Giornali di Modena.										
Il Diritto Cattolico . .	1.58	0.41	26	2.67	3	168	64	4.1	30.4	47
	1.75	0.33	19	1.67	3	96	64	2.4	31.2	48
Il Panaro	1.83	0.33	17	2 75	3	150	62	4.4	30.0	48
	1.70	0.33	19	2.08	3	122	62	3.3	30.0	48
La Provincia di Modena	1.50	0.23	15	2.75	3	183	63	4.3	29.6	46
	1.41	0.25	17	1.67	3	118	63	2.6	36.4	77
Giornali di Udine.										
Il Friuli	1.50	0.25	16	1.83	2.7	122	63	2.9	33.4	53
Il Giornale di Udine.	1.67	0.33	19	1.83	2.7	109	63	2.9	33.0	52
	1.41	0.25	17	1.83	3.0	129	63	2.9	33.4	53
La Patria del Friuli .	1.83	0.33	18	1.94	2.7	106	60	3.2	27.6	45
Giornali medici.										
Gazzetta Internazionale di Medicina	1.67	0.33	19	1.67	2.4	100	95	1.7	48	50
	1.25	0.25	20	1.67	3.6	125	95	1.7	56	58
Rivista di Ingegneria Sanitaria	1.41	0.25	17	3.00	2.3	212	86	3.4	47	54
	1.33	0.25	18	2.72	2.7	181	86	2.8	49	56

Spazio fra lettera e lettera in mm.	Rapporto % fra lo spazio fra le gambe di un n e quello fra lettera e lettera	Numero delle lettere in un cm² (media di 5 cm²)	Spazio fra parola e parola in mm.	Proporzione % in cui questo carattere si trova in rapporto alla superficie del giornale	CARTA					
					Grossezza in mm.	Colore	Trasparenza	Contenuto in legno	Lucidità	Ombreggiatura
0.83	71	15.2	2.58	60	0.060	bianco grigio	trasp.	abbond.	non lucida	non ombregg.
0.75	77	13.0	2.58	5						
0.75	89	14.4	2.67	10	0.060	»	poco trasp.	»	»	»
0.66	88	14.8	2.33	44						
0.88	75	16.2	2.67	17	0.065	»	»	»	»	»
0.66	65	18.4	2.42	35						
0.66	87	12.4	2.33	50	0.065	bianco grigio	opaca	abbond.	non lucida	non ombregg.
0.58	86	15.4	3.17	40	0.060	»	poco trasp.	»	»	»
0.75	66	16.4	2.33	12						
0.66	100	15.0	1.94	56	0.065	»	opaca	mediocre	»	»
0.75	88	15	2.52	variab.	0.070	bianco latte	opaca	abbond.	poco lucida	non ombregg.
0.58	100	25	1.58							
0.66	100	14	2.58	variab.	0.100	bianco	»	mediocre	mólto lucida	»
0.61	100	19	2.33							

Segue TABELLA VI.

	STAMPA									
	Altezza della lettera *n* in mm.	Spessore astale in mm.	Rapporto % fra spessore astale e altezza	Altezza dell' interlineo in mm.	Numero delle righe per cm.	Rapporto % fra interlineo e altezza delle lettere	Lunghezza delle righe in mm.	Rapporto % fra interlineo e lunghezza delle righe	Numero delle lettere per riga (media di 5 righe)	Numero delle lettere in 100 mm.
Annali di Igiene . . .	1.50	0.33	22	3.00	2.2	200	111	2.7	58	52
	1.33	0.33	24	1.67	3.3	125	111	1.5	65	58
Salute Pubblica . . .	1.50	0.25	16	2.83	2.6	188	63	4.4	32	50
Avvisatore Sanitario .	1.50	0.25	16	2.50	2.5	166	108	2.3	64	59
	1.33	0.25	18	2.17	2.7	163	108	2.0	70	64
Rivista di Igiene e Sanità Pubblica	1.50	0.30	20	2.83	2.3	188	103	2.7	56	54
	1.41	0.25	17	1.50	2.7	106	103	1.4	68	66
Giornale della R. Società Ital. di Igiene	1.75	0.30	17	2.58	2.2	147	112	2.3	50	44
	1.67	0.33	19	2.42	2.5	144	112	2.1	52	46
Giornale della Società Fiorentina d'Igiene	1.50	0.33	22	2.58	2.4	172	95	2.7	49	51
	1.50	0.33	22	2.17	2.7	144	95	2.2	52	54

Spazio fra lettera e lettera in mm.	Rapporto % fra lo spazio fra le gambe di un n e quello fra lettera e lettera	Numero delle lettere in un cm² (media di 5 cm²)	Spazio fra parola e parola in mm.	Proporzione % in cui questo carattere si trova in rapporto alla superficie del giornale	CARTA: Grossezza in mm.	Colore	Trasparenza	Contenuto in legno	Lucidità	Ombreggiatura
0.75	66	13	3.00	variab.	0.080	bianco	poco trasp.	abbond.	non lucida	non ombregg.
0.66	75	21	2.00							
1.00	66	16	2.83	variab.	0.100	bianco giallo	opaca	»	»	»
0.75	66	14	2.25	variab.	0.090	bianco	»	»	»	»
0.66	75	16	1.92							
0.83	69	13	1.92	variab.	0.090	»	»	»	»	»
0.66	87	19	1.67							
0.83	79	13	2.67	variab.	0.080	»	trasp.	»	»	»
0.83	79	18	2.42							
0.66	87	14	2.33	variab.	0.100	»	opaca	»	»	»
0.58	86	18	2.25							

TABELLA VII.

	STAMPA									
	Altezza della lettera x in mm.	Spessore astale in mm.	Rapporto % tra spessore astale e altezza	Altezza dell' interlineo in mm.	Numero delle righe per cm.	Rapporto % fra interlineo e altezza delle lettere	Lunghezza delle righe in mm.	Rapporto % fra interlineo e lunghezza delle righe	Numero delle lettere per riga (media di 5 righe)	Numero delle lettere in 100 mm.
Giornali letterarii illustrati.										
La Nuova Antologia	1.67	0.33	19	2.00	2.7	119	113	1.7	56	49
	1.33	0.25	18	1.92	3.0	144	53	3.6	29	54
Ars et Labor	1.33	0.25	18	2.00	3.4	150	132	1.5	69	52
	1.08	0.16	14	1.50	3.8	138	62	2.4	47	75
Emporium	1.50	0.33	22	1.42	2.4	94	73	1.9	41	56
L'Italia Moderna	1.41	0.33	23	2.17	2.7	153	72	3.0	36	50
	1.33	0.33	24	2.33	2.7	175	72	3.2	39	54
Il Secolo XX	1.50	0.25	16	1.83	3.0	122	62	2.9	35	56
	1.16	0.16	13	1.92	3.4	165	62	3.0	39	62
La Lettura	1.41	0.25	17	2.33	2.7	165	72	3.2	37	51
	1.33	0.25	18	1.67	3.4	125	72	2.3	45	62
La Domenica del Corriere	1.25	0.25	20	1.50	3.4	120	57	2.6	35	48
La Tribuna Illustrata	1.25	0.16	12	1.58	2.9	126	75	2.1	41	54
L'Avanti della Domenica	1.25	0.21	16	2.33	2.7	186	67	3.4	37	55
	1.08	0.20	18	1.67	3.3	154	67	2.4	52	77
Il Secolo Illustrato	1.16	0.16	13	1.58	3.8	136	61	2.5	36	59
L'Illustrazione Italiana	1.41	0.25	17	1.83	3.0	129	74	2.4	35	47
	1.25	0.20	16	1.58	3.4	126	74	2.1	47	63

Spazio fra lettera e lettera in mm.	Rapporto % fra lo spazio fra le gambe di un *n* e quello fra lettera e lettera	Numero delle lettere in un cm² (media di 5 cm²)	Spazio fra parola e parola in mm.	Proporzione % in cui questo carattere si trova in rapporto alla superficie del giornale	CARTA					
					Grossezza in mm.	Colore	Trasparenza	Contenuto in legno	Lucidità	Ombreggiatura
0.75	88	15	2.42	massima parte	0.100	bianco latte	poco traspar.	abbon-dante	non lucida	non om-breggiato
0.66	87	17	2.33	poca parte						
0.58	86	21	1.92	variabile	0.080	bianco	opaca	mediocre	lucida	»
0.50	82	30	1.58	»		bianco giallo	poco traspar.	molto abbond.	non lucida	»
0.58	86	15	2.08	»	0.100	bianco	opaca	mediocre	lucida	»
0.83	60	16	1.92	»	0.070	bianco latte	traspa-rente	abbon-dante	non lucida	»
0.58	86	19	2.00	»						
0.66	100	15	2.25	»	0.090	bianco	opaca	mediocre	lucida	»
0.75	86	22	2.83	»		bianco giallo	traspa-rente	»	»	»
0.66	100	22	2.58	»	0.080	bianco	opaca	abbon-dante	poco lucida	»
0.83	60	15	2.00	»						
0.75	80	22	2.30	»	0.090	»	poco traspar.	»	non lucida	»
0.66	87	21	2.25	»	0.070	»	opaca	»	»	»
0.66	87	16	3.27	»	0.080	»	»	»	poco lucida	»
0.50	82	25	1.50	»						
0.66	100	23	2.42	»	0.080	»	»	»	non lucida	»
0.75	88	18	2.42	»	0.090	»	»	mediocre	lucida	»
0.66	80	19	2.30	»						

ISTITUTO D'IGIENE DELLA UNIVERSITÀ DI ROMA

Dialisi del liquido peritoneale " aggressinico „ nell'infezione sperimentale da B. coli

per il dott. D. DE BLASI.

Dallo studio della così detta proprietà aggressiva dei batteri si sono in breve tempo messi in chiaro tali fatti da permettere, almeno in parte, una più precisa conoscenza del meccanismo d'infezione e forse anche la conquista di più sicuri procedimenti d'immunizzazione per alcune malattie infettive.

Il liquido peritoneale di un animale, inoculato nel peritoneo con un dato microrganismo, mostra di possedere tali proprietà aggressive. Infatti se dopo raccolto dalla cavità addominale, si centrifuga a lungo, esso resta separato in una porzione corpuscolata, impigliata talvolta in un po' di fibrina, e in una porzione soprastante liquida quasi chiara. La seconda porzione aggiunta ad una dose subletale di batteri della stessa specie di quelli coi quali si è ottenuto l'essudato, ed inoculata nel peritoneo di un animale, determina un'infezione rapida e grave con esito letale: in altre parole rende letale una dose di coltura batterica, che per sè sola non sarebbe capace di produrre la morte dell'animale.

Il fatto fu già osservato da Terni e Bandi per il *B.* della peste bubbonica: fu poi largamente studiato da circa un anno a questa parte dal Bail e da altri. Questa proprietà di aggravare ed accelerare l'infezione si suppone legata alla presenza di speciali sostanze, che già furono dal Kruse ammesse e denominate *lisine* e che ora, per proposta del Kruse stesso, si chiamano aggressine, avendo oggidì la parola « lisine » assunto ben altro significato negli studi sull'immunità.

Per il *B. coli*, come per molti altri, è stata anche sperimentalmente dimostrata la possibilità di ottenere degli essudati aggressivi (Bail, Dörr). Avendo a disposizione uno stipite di *B. coli* abbastanza virulento, ho voluto ricercare se fosse possibile di ottenere la separazione dell'aggressine, non certamente nel senso chimico della parola, ma allo scopo di riconoscere a quale delle sostanze proteiche dell'essudato esse restano legate.

Dirò in ultimo dell'importanza che potranno avere queste indagini.

Lo stipite di *B. coli* adoperato fu isolato dalle feci diarroiche di un bambino. Fu conservato virulento, nei primi mesi dopo l'isolamento, mediante passaggi ripetuti attraverso il corpo della cavia.

Dal decembre 1905 in poi fu conservato in terreno sterile a temperatura ambiente, nel qual mezzo mantenne immutato il grado della sua virulenza, pari a un'ansa normale per cavie del peso medio di 220 g. Isolato dal terreno nel novembre 1906, fu conservato in agar con frequenti passaggi, durante tutto il tempo delle esperienze, mantenendosi finora costante, anche in tal modo, la virulenza del germe.

Per ottenere un essudato peritoneale aggressinico inoculavo nel peritoneo di una cavia del peso medio di 200 gm., due anse normali di *B. coli*, equivalenti a 2 DML. La morte avviene fra le 8 e le 12 ore. Appena morto l'animale, talora sacrificatolo apposta, mentre era in agonia, estraevo dal peritoneo, mediante una pipetta Pasteur sterile, l'essudato torbido, lo versavo poi in una comune provetta sterilizzata, vi aggiungevo altrettanto volume di soluzione di NaCl 0,85 % e poi centrifugavo subito, per tre volte consecutive, mezz'ora per volta (3000 giri al minuto). Separavo il liquido soprastante quasi limpido: in esso si trovano ancora parecchi batteri, mentre però la maggior parte di essi trovansi precipitati insieme con gli altri elementi figurati presenti nell'essudato. Per escludere l'eventuale azione di questi germi nelle successive inoculazioni, il Bail ed altri usano di aggiungere cloroformio, toluolo o fenolo, e di tenervelo a contatto per alcune ore. Ho fatto uso del cloroformio, generalmente adoperato in ricerche consimili; in tutti i casi la minima durata del contatto è stata di 14-15 ore, alla temperatura di 12°-14° C,. Accertata la proprietà aggressiva degli essudati così ottenuti, mi accinsi alla ricerca prefissami.

Mi sono servito della dialisi attraverso pergamena naturale, della cui bontà mi assicuravo prima e mi assicuravo in ogni modo durante le singole esperienze, saggiando la reazione del biurete nel liquido dializzato. Dializzavo in abbondante acqua distillata, che ricambiavo tre o quattro volte al giorno: arrestavo la dialisi quando il dializzato non mi dava più reazione sensibile col $Ag\,NO_3$.

Il materiale rimasto sul dializzatore filtravo per carta bibula. Il filtrato dà la reazione del biureto. Lavavo il precipitato rimasto sul filtro con acqua distillata sterilizzata, e poi sospendevo il precipitato in soluzione di Na Cl 0,85 %. Questa sospensione dà anch'essa la reazione del biureto. Il filtrato contiene l'albumina, la sospensione contiene le globuline, e verosimilmente piccole quantità di nucleoproteidi.

La dialisi durò 4–5 giorni in media, tempo sufficiente, se si pensa che disponevo sempre di pochi cmc. di essudato. Le manipolazioni furono fatte col maggior riguardo possibile alla sterilità: nel dializzatore era sempre tenuto del cloroformio, e del nuovo se ne aggiungeva di tanto in tanto, agitando ogni volta. L'apparecchio era tenuto in una cassetta chiusa, al buio, ed a temperatura di 16-17° C.

Prima di inoculare i vari liquidi, allontanavo il cloroformio non disciolto ed evaporavo in bagnomaria a 37°C. per un'ora per discacciare la maggior parte di quel poco che rimane disciolto.

Riassumo in tabelle le esperienze eseguite in cavie del peso di 200-230 g.

Esperienza I. — Essudato peritoneale di due cavie. Volume totale, dopo l'aggiunta della soluzione di Na Cl e la decantazione, cmc. 9. Se ne mettono a parte 4 cmc., con aggiunta di cloroformio, e si conservano accanto al dializzatore. Gli altri 5 cmc. si dializzano in presenza di cloroformio e si trattano poi nel modo descritto.

Tabella I.

Inoculazioni fatte il 10 dicembre 1906.

Animale inoculato	Liquido + Agarcoltura di *B. coli* di 20 h.		Esito
Cavia n. 1 . .	Essudato aggressinico cmc. 1.5	¼ D. M. L.	Morte in 12 ore. Essudato nel peritoneo
» » 2 . .	Frazione albumina cmc. 2.5	»	»
» » 3 . .	»	»	»
» » 4 . .	Frazione globulina cmc. 5	»	Sopravvive
» » 5 . .	»	»	»
» » 6 . .	0	»	»
» » 7 . .	Essudato aggressinico cmc. 2	0	»

Da questa prima esperienza appare che *la frazione albumina manifesta proprietà aggressiniche, mentre ne è sfornita la frazione globuline.*

Avverto che, allo scopo di riconoscere se la proprietà aggressinica resta legata alla frazione albumina, bisognerebbe inoculare tanta albumina quanta ne è contenuta in 1.5 cmc. di essudato aggressinico. Se il liquido sul dializ-

zatore non crescesse di volume e non si perdesse un po' di sostanza durante le varie operazioni, avrei dunque dovuto inoculare poco più di 1.5 cmc. di frazione albumina. Ma ne ho sempre inoculato, in questa e nelle successive esperienze, una quantità alquanto maggiore, appunto per compensare approssimativamente queste due cause d'errore inevitabili.

Per contrario, della frazione globuline facevo tante porzioni eguali, quanti erano gli animali da inoculare.

Esperienza II. — Essudato peritoneale raccolto da sette cavie. Volume totale, dopo la diluzione e la decantazione. cmc. 20. Se ne conservano, con aggiunta di cloroformio, 4. Dei rimanenti, 8 cmc. sottopongo alla dialisi in presenza di cloroformio; gli altri tratto con $MgSO_4$ secondo il metodo di Hammarsten, arrestandomi alla lavatura con soluzione satura di $MgSO_4$.

TABELLA II.

Inoculazioni fatte il 18 dicembre 1906.

Animale inoculato	Liquido peritoneale + *B. coli* di 20 h.		Esito
a) Materiale ottenuto per dialisi:			
Cavia n. 8 . .	Essudato aggressinico cmc. 1.5	¼ D. M. L.	Morto in 12 ore. Essudato nel peritoneo
» » 9 . .	Frazione albumina cmc. 2.5	»	»
» » 10 . .	Frazione albumina cmc. 2	»	Morto in 24 ore. Essudato nel peritoneo
» » 11 . .	Frazione globuline cmc. 5	»	Morto in 12 ore. Stravaso emorragico nel peritoneo
» » 12 . .	»	»	Morto in 24 ore. Mancanza di essudato nel peritoneo
b) Materiale ottenuto per precipitazione con Mg SO_4:			
Cavia n. 13 . .	Frazione globuline cmc. 5	¼ D. M. L.	Morto in 12 ore. Essudato nel peritoneo
» » 14 . .	»	»	»
c) Controlli:			
Cavia n. 15 . .	0	¼ D. M. L.	Sopravvive
» » 16 . .	Essudato aggressinico cmc. 2	0	»

N. B. Del materiale ottenuto col metodo di Hammarsten, saggiai l'azione aggressinica soltanto nella frazione globuline. Per esperimentare la frazione albumina bisognava anzi tutto sottoporla alla dialisi per allontanare il Mg SO_4. Così feci infatti; ma ancora dopo 10 giorni il dializzato mi dava la reazione del Mg SO_4, e perciò non mi fidai di fare alcuna esperienza dopo un tempo così lungo.

Questa seconda esperienza dunque conferma per la frazione albumina quanto risultò dalla prima esperienza. Per la frazione globuline, non tenendo conto della cavia nella quale fu riscontrato lo stravaso emorragico, certo è che manifestò sull'altra cavia proprietà aggressiniche, con questa differenza, che non fu trovato essudato nel peritoneo. Positivo e netto come per la frazione albumina fu l'esperimento fatto con la frazione globuline ottenute per precipitazione.

Esperienza III. — Essudato peritoneale raccolto da quattro cavie. Volume totale, dopo la diluzione e la decantazione, cmc. 8. Se ne lasciano a parte cmc. 4 e gli altri 4 si dializzano nel modo indicato nelle precedenti esperienze.

Tabella III.

Inoculazioni fatte il 22 dicembre 1906.

Animale inoculato	Liquido peritoneale + *B. coli* di 20 h.		Esito
Cavia n. 17 . .	Essudato aggressinico cmc. 1.5	¼ D. M. L.	Morto in 12 ore. Essudato nel peritoneo
» » 18 . .	Frazione albumina cmc. 2.5	»	»
» » 19 . .	Frazione albumina cmc. 1.5	»	»
» » 20 . .	Frazione globuline cmc. 3.5	»	Sopravvive
» » 21 . .	»	»	Morto in 12 ore. Mancanza di essudato nel peritoneo
» » 22 . .	0	»	Sopravvive
» » 23 . .	Essudato aggressinico cmc. 2	0	»

Anche qui si conferma sempre il risultato ottenuto colla frazione albumina. La globulina in un caso fu vista sfornita di proprietà aggressiniche. Nell'altro caso invece la proprietà aggressinica si è resa manifesta, però con la particolarità della mancanza di essudato.

Esperienza IV. — Essudato peritoneale ottenuto da due cavie. Volume totale, dopo il solito trattamento, cmc. 6. Se ne lasciano a parte cmc. 3.5 e i rimanenti si dializzano nel solito modo e con le solite precauzioni.

TABELLA IV.

Inoculazioni fatte il 26 dicembre 1906.

Animale inoculato	Liquido peritoneale + *B. coli* di 20 h.		Esito
Cavia n. 24 . .	Essudato aggressinico cmc. 1.5	¼ D. M. L.	Morte in 12 ore Essudato nel peritoneo
» » 25 . .	Frazione albumina cmc. 2	»	»
» » 26 . .	Frazione globuline cmc. 2	»	»
» » 27 . .	0	»	Sopravvive
» » 28 . .	Essudato aggressinico cmc. 1.5	»	0

Anche in questa esperienza il risultato è stato lo stesso per la frazione albumina e per la frazione globuline.

***

Lasciando ora da parte i risultati ottenuti colla globulina precipitata, che possono essere affetti da varie cause d'errore, sulle quali non è qui il caso d'intrattenersi, e riflettendo che dopo la filtrazione fatta per separare dall'albumina le globuline precipitate colla dialisi, la lavatura di queste potesse essere stata insufficiente, feci un'altra esperienza, nella quale, dopo aver filtrato il liquido rimasto sul dializzatore nel modo solito, lavai copiosamente con acqua distillata sterilizzata, raccogliendo tutta la lavatura e concentrandola poi a 37° C. (sempre in presenza di cloroformio) fino a volume di 4 cmc. Il liquido concentrato dà la reazione del biurete.

ESPERIENZA V. — Essudato estratto dal peritoneo di cinque cavie. Volume totale, dopo il solito trattamento, cmc. 15. Si mettono a parte 4 cmc.; gli altri si dializzano *more solito*.

TABELLA V.

Inoculazioni fatte il 2 gennaio 1907.

Animale inoculato	Liquido peritoneale + *B. coli* di 20 h.		Esito
Cavia n. 29 . .	Essudato aggressinico cmc. 2	¼ D. M. L.	Morte in 7 ore. Essudato nel peritoneo
» » 30 . .	Frazione albumine cmc. 3	»	Morte in 12 ore. Essudato nel peritoneo
» » 31 . .	»	»	»
» » 32 . .	»	»	Morte in 7 ore. Essudato nel peritoneo
» » 33 . .	Frazione globoline cmc. 4	»	Sopravvive
» » 34 . .	»	»	Morte in 12 ore. Essudato nel peritoneo
» » 35 . .	Acqua di lavatura della globoline cmc. 4	»	»
» » 36 . .	0	»	Sopravvive
» » 37 . .	Essudato aggressinico cmc. 2	0	»

Anche da questa ultima esperienza *resta dunque confermato quanto si riferisce all'azione aggressinica della frazione albumina.*

Rileviamo inoltre dalla tabella questo fatto, che la porzione di albumina rimasta aderente alla globuline dopo la filtrazione è stata bastevole a produrre effetti aggressinici (cavia n. 35).

Questo potrebbe far congetturare una spiegazione per le proprietà aggressiniche dimostrate talvolta anche dalla frazione globuline, se però in questa esperienza la frazione globuline, nonostante la copiosa lavatura, non avesse in un caso dimostrato ancora proprietà aggressive (cavia n. 34).

I risultati di altre esperienze più estese e più particolareggiate potranno forse contribuire a rischiarare i rapporti fra le aggressine ed altre sostanze segregate o eliminate dai corpi batterici, e ad ottenerle in uno stato di maggior purezza, sapendosi che molte altre

sostanze dei corpi batterici precipitano durante la dialisi. In ogni modo ho creduto conveniente di comunicare questa prima serie di esperienze, dalle quali già risulta che *la frazione albumina ottenuta nel modo indicato dai liquidi peritoneali aggressivi per il* B. coli, *mostra di contenere costantemente aggressine*, mentre la frazione globuline se ne mostrerebbe per lo più sprovvista o almeno scarsamente fornita.

Ho motivo di credere che queste ricerche potranno acquistare ben maggiore importanza teoretica e pratica. Teoretica, perchè se la frazione albumina degli essudati aggressinici, conservando la proprietà aggressinica, si mostrerà priva o scarsamente dotata di proprietà tossiche (il che pare verisimile, se si pensa che le sostanze costituenti i corpi batterici precipitano per lo meno in gran parte durante la dialisi), si potrà riconoscere più agevolmente se le aggressine sono veramente sostanze nuove e differenti dalle altre sostanze prodotte dai batteri, come asserisce il Bail, o pur no, come sostengono parecchi autori, fra i quali Wasserman e Citron sono i più tenaci.

L'importanza pratica sarà subito intraveduta quando si rifletta che, mentre le aggressine prodotte dai parassiti perfetti nel senso di Bail, non sono tossiche e quindi si prestano a tentare il nuovo metodo d'immunizzazione antiaggressinica, le aggressine prodotte dai semiparassiti (come sarebbero appunto il *B.coli*, il *B. typhi*, ecc.), manifestano spesso proprietà tossiche, quando si ripetono negli animali più inoculazioni. Ora se la frazione albumina si dimostrerà del tutto o quasi sfornita di proprietà tossiche, possederemo un mezzo innocuo e sicuro per provocare l'immunità antiaggressinica. È ben vero che per il colera, per il tifo e per altre infezioni di semiparassiti già si conoscono e utilizzano parecchi procedimenti d'immunizzazione, che mirano tutti a provocare un potere battericida o antitossico nell'organismo animale; ma sappiamo anche che in pratica i sieri degli animali immunizzati con tali metodi verso i semiparassiti, non hanno avuto ancora quel successo costante e incontrastato che vanta, p. es., la sieroterapia antidifterica. Perciò l'argomento della immunità antiaggressinica è degno di essere largamente e minutamente studiato.

ISTITUTO D'IGIENE DELLA R. UNIVERSITÀ DI ROMA

Osservazioni sulla resistenza vitale e sulla conservazione della virulenza del *B. coli commune*

per i dottori G. SAMPIETRO e C. ZONCHELLO.

Le nostre ricerche, eseguite sul *B. coli commune*, Escherich, riguardano:

a) il comportamento della resistenza vitale, delle attività biologiche, e della virulenza del *B. coli* nel terreno sterilizzato e nei liquidi organici — essudato peritoneale e sangue — prelevati da animali in preda ad acuta colisetticemia. (Ricerche eseguite dal dott. Sampietro);

b) il comportamento dello stesso germe di fronte agli agenti fisici. (Ricerche eseguite dal dott. Zonchello).

Le esperienze furono fatte sopra tre stipiti di *B. coli*, con tipici caratteri morfologici e biologici, isolati da feci di bambini affetti da diarrea estiva. Questi germi, che avevano originariamente una virulenza pari a 1/10 di ansa normale per 250 gr. di cavia, presentavano all'inizio di queste nostre ricerche una virulenza di un'ansa normale per due stipiti (3 e 4) e di due anse normali per il terzo stipite (2).

I. — Ricerche sul B. coli conservato in terreno sterilizzato.

Scopo di queste ricerche fu di studiare come si comportasse la vitalità e la virulenza del *B. coli* nel terreno, specialmente sotto le influenze circumambienti e stagionali, indagando anche se avvenissero eventuali mutazioni nelle sue attività biologiche.

Scelsi della terra di giardino, che essiccai in stufa a circa 200° per 2 ore, e sottoposi poi per due volte alla sterilizzazione in autoclave a 3 atmosfere, sino a quando cioè mi riuscirono negative le colture fatte in aerobiosi e anaerobiosi ed il terreno, che anche dopo la prima sterilizzazione in auto-

clave si era dimostrato tetanigeno, inoculato in parecchie cavie non diede luogo a nessun fatto morboso.

Il terreno, così sterilizzato, venne distribuito verso la metà di dicembre del 1905 in recipienti di vetro giallo a largo collo, ed in ciascuno di essi furono versati circa 10 cmc. di brodocoltura di 24 ore, così del *B. coli* 3 come dello stipite 4.

Un recipiente per ciascuno stipite misi a 37°, a temperatura ambiente in un angolo del laboratorio, e un altro sopra il tetto dell'Istituto, in luogo riparato dai raggi solari diretti, ma esposto però a tutte le altre vicissitudini atmosferiche. Ebbi cura di inumidire di quando in quando, con poca soluzione fisiologica sterilizzata, il terreno lasciato a 37°.

Ad epoche diverse isolai dai vari alberelli il *B. coli*; per questo con una robusta ansa di platino prima bagnata in soluzione fisiologica sterile asportavo un poco di terreno che distribuivo sopra dell'agar Drigalski-Conradi. Dopo 12-20 ore da una o più colonie (*e sempre ebbi e solo delle tipiche colonie rosse*) faceva un passaggio per strisciamento sull'agar da cui prelevavo le dosi da inoculare nelle cavie per stabilire il titolo della virulenza e facevo gli opportuni passaggi per l'identificazione del germe e per studiarne gli eventuali cambiamenti nelle attività biologiche. E non solo mi era possibile una identificazione di specie, ma anche di stipite mediante la reazione agglutinante, fatta con siero di conigli immunizzati, e che, come è noto dagli studi di vari AA. e confermato dal De Blasi (1), e come io stesso ho avuto ad osservare tentando di avere dai conigli sieri agglutinanti, è specifica solo per il *B. coli* corrispondente.

La titolazione della virulenza fu fatta inoculando per via peritoneale una o più anse normali di agarcultura emulsionate in brodo od opportune diluzioni delle prime emulsioni.

Terreno inquinato con B. coli *tenuto a 37°.*

TABELLA I.

Data dell' inquinamento	Stipite di *B. coli*	Isolamento	Dose minima letale del germe isolato (per 250 gr. di cavia)
11 dicembre 1905. . . .	3	17 marzo 1906 +	1 ansa normale
Id.	»	30 marzo 1906 +	»
Id.	4	17 marzo 1906 +	»
Id.	»	30 marzo 1906 +	»
Id.	»	21 aprile 1906 —	—

Terreno inquinato con B. coli *tenuto a temperatura ambiente nel laboratorio ed esposto alle vicissitudini atmosferiche.* — La vitalità e la virulenza per i due stipiti conservati in queste diverse condizioni, sono andate in modo così concorde che mi è possibile riunire i risultati in uno solo specchietto.

TABELLA II.

Data dell'inquinamento	Isolamento	Dose minima letale (per 250 gr. di cavia)
11 dicembre 1905 . .	17 marzo 1906 +	1 ansa normale
Id. . .	30 marzo 1906 +	1 »
Id. . .	21 aprile 1906 +	1 ansa normale per lo stipite 3 $^1/_2$ » » 4
Id. . .	23 maggio 1906 +	$^1/_5$ »
Id. . .	3 luglio 1906 +	$^1/_5$ »
Id. . .	30 luglio 1906 +	$^1/_5$ »

I successivi isolamenti furono fatti solamente per lo stipite 4 dal terreno esposto sul tetto e sempre con risultato positivo; variò invece la virulenza nel senso che ricercandola sopra *B. coli* provenienti da diverse colonie della stessa piastra i risultati ottenuti dimostravano che, *mentre alcuni individui conservavano nel terreno la virulenza primitiva, altri o l'avevano diminuita o persino perduta*. Ciò risulta dalla seguente tabella:

TABELLA III.

Data dell'isolamento	Colonie isolate	Dose minima letale in grammi (per 250 gr. di cavia)
15 ottobre 1906	I	tre anse normali
Id.	II	una patina non uccide
5 novembre 1906.	I	» »
20 novembre 1906.	I	due anse normali
Id.	II	»
Id.	III	un'ansa normale
2 dicembre 1906	I	»
Id.	II	una patina non uccide
Id.	III	un'ansa normale
Id.	IV	»
27 dicembre 1906	I	»
Id.	II	una patina non uccide
Id.	III	un'ansa normale

Considerazioni. — Dalle mie osservazioni resta assodato il fatto he il *B. coli* in terreno sterilizzato, lasciato alla temperatura ambiente, resta vitale anche per più di un anno, sia il terreno conservato in luogo riparato, sia esposto a tutte le vicissitudini atmosferiche, eccezione fatta dell'azione diretta dei raggi solari, sopportando benissimo l'azione della luce diffusa, la rigidità dei mesi invernali ed il calore dei mesi estivi, calore che veniva aumentato anche dalla infocata irradiazione delle tegole del tetto. Nel terreno invece, conservato a una costante temperatura di 37°, gl'isolamenti riescono negativi in capo a 130 giorni.

La spiegazione del fatto va ricercata nell'essiccamento dovuto all'atmosfera asciutta della stufa, non ostante che avessi cura di aggiungere di quando in quando al terreno piccola quantità di soluzione fisiologica.

La lunga resistenza vitale del *B. coli* nel terreno sterilizzato, esposto alle condizioni ambiente, corrisponde a quanto fu osservato. pure in terreno sterilizzato, per il *B. typhi* da Martin (9) (15 mesi), da Robertson (12) (11 mesi), da Rullmann (14) (18 mesi), mentre in terreno non sterilizzato la vitalità del germe si esaurisce molto prima (4). Levy e Kayser (7) osservarono pure la resistenza del *B. typhi* nelle feci anche esposte ai rigori invernali. Scarse invece sono le ricerche fatte a questo proposito sul *B. coli*: Horrocks (4) studiando la resistenza di questo germe in vari campioni di terreno, trovò una sopravvivenza massima di 90 giorni e Savage (15) in fango di mare non sterilizzato e sterilizzato, trovò che il *B. coli* vi resisteva solo per 42 giorni.

Di maggiore importanza è il fatto che nel terreno, almeno nelle mie condizioni di esperienza, il *B. coli* oltre che vivere a lungo. conserva la virulenza per un tempo prolungato. Infatti risulta dalle tavole come i due stipiti di *B. coli* conservati nel terreno a 37° non modificano la loro virulenza originaria durante 109 giorni. Risultati degni di maggior considerazione ho ottenuto però coi *B. coli* tenuti in terreno sterile alla temperatura ambiente ed esposto per più di un anno alle varie condizioni atmosferiche. In queste condizioni la virulenza dei due stipiti si mantenne immutata dal dicembre sino verso la fine di aprile; durante i mesi più caldi dell'anno, dal maggio al luglio, essa si esaltò da un'ansa normale a $^1/_8$ di ansa normale per 250 gr. di cavia, fatto non occasionale perchè contemporaneamente avvertito sopra due stipiti.

Si potrebbe dire che il terreno oltre che conservare per lunghi mesi l'attività patogena dei germi, è capace anche, coll'aiuto di spe-

ciali condizioni ambiente, fra cui forse sopratutto la temperatura elevata, di esagerarla; esaltazione di virulenza che del resto venne già osservata da Paladino-Blandini per il *V. cholerae asiaticae* (10) quando dai comuni terreni si passi nel suolo.

Le osservazioni fatte durante i primi mesi di autunno potevano lasciare supporre che il *B. coli*, avesse di molto diminuito o anche del tutto perduto la sua virulenza, ma le ricerche eseguite nel novembre-dicembre, isolando parecchie colonie e stabilendo per ciasuna di esse la dose minima letale, provano che, se con il cambiarsi delle condizioni meteoriche alcuni individui risentono una diminuzione od una perdita nella loro più importante azione biologica, *la maggior parte però dei germi mantiene ancora immutata la virulenza che possedevano quando furono messi nel terreno;* non è però più possibile trovare individui che abbiano tale loro potere patogeno esaltato, come durante i mesi estivi.

Che il terreno sterilizzato conservi e, in opportune condizioni, esalti il potere patogeno del *B. coli*, si può affermare con sicurezza tanto più che, avendo avuto cura, ogni volta isolava il germe dal terreno, di controllare anche la virulenza dello stesso conservato con successive colture in agar, ho constatato che per ambedue gli stipiti già nel mese di gennaio il potere patogeno era ridotto a tre anse normali, e in giugno era diminuito di tanto che due patine su agar di 20 ore inoculate nel peritoneo di cavie di 250 gr. erano inoffensive. Controllai anche volta per volta il potere patogeno degli stessi due stipiti conservati virulenti mediante il passaggio attraverso il corpo delle cavie. Tale virulenza oscillò sino al mese di luglio fra un'ansa e mezza ansa normale, senza raggiungere mai una dose minima letale di $^1/_5$ di ansa normale come durante l'estate osservai per gli stessi stipiti conservati nel terreno. Nei consecutivi passaggi da animale a animale i due germi anzi divennero ancora meno virulenti, e da poco anzi neppure una intiera patina in agar di 20 ore riesce ad uccidere una cavia di 250 gr. I due germi quindi isolati da feci diarroiche nel luglio 1905, dotati originariamente di una virulenza pari a $^1/_{10}$ di ansa, ridotta a un'ansa normale nel mese di dicembre dello stesso anno, da questa epoca a dodici mesi e mezzo dopo hanno perduto o di molto diminuito il loro potere patogeno conservati nei comuni terreni o con passaggi ripetuti e frequenti attraverso l'animale, mentre in suolo sterile, per quanto esposto alla luce solare diffusa ed alle differenze stagionali di temperatura, la virulenza ha conservato lo stesso titolo ed anzi, durante la stagione calda, si è esaltata.

Inoltre i germi isolati dal terreno, passandoli da agar ad agar, conservano poi il titolo della loro virulenza, molto più a lungo, persino 2-3 mesi, che non quando siano ripresi dagli animali, e non presentano quasi mai quelle oscillazioni nella dose minima letale, che rendono le esperienze più lunghe e penose. E durante i mesi estivi partendo dai *B. coli* isolati dal terreno che avevano la dose minima letale di $^{1}/_{5}$ di ansa normale, molto più facilmente di quello che mi fosse possibile con gli stessi germi conservati virulenti col passaggio attraverso gli animali, ed in tempo più breve, poteva ad essi ridare l'originaria virulenza di $^{1}/_{10}$ di ansa normale per 250 gr. di cavia, sia inoculandoli contemporaneamente alle rispettive aggressine, sia inoculando direttamente da cavia a cavia il liquido peritoneale, metodo che Rodet e Lagriffoul (13) proposero per l'esaltamento del *B. typhi.*

Mi sembra quindi accettabile come *buona pratica di laboratorio per la conservazione della virulenza del B. coli*, che generalmente richiede tempo e fatica ed è non poco dispendiosa, il semplice metodo da me esperimentato, tanto più che il terreno è mezzo capace di esaltare in opportune condizioni, il potere patogeno, e che i germi da esso isolati mantengono il titolo della loro virulenza più costantemente e più a lungo, che non con gli altri metodi abituali. Dati questi vantaggi è lieve inconveniente l'eventualità di imbattersi dopo 9-10 mesi in qualche individuo che, come primo sintomo della sua decadenza vitale, dimostra uno scarso potere patogeno.

Dal punto di vista igienico poi queste ricerche, dimostrando che il *B. coli può nel terreno conservare la sua vitalità e la sua virulenza per lunghi mesi, e, in condizioni opportune come nella stagione estiva, anche esaltare il suo potere patogeno*, mi permettono di porre il problema: se esiste un rapporto fra terreno, *B. coli*, e infezioni colibacillari. Le condizioni delle mie ricerche troppo sono diverse da quelle naturali, perchè mi sia dato risolverlo, ma lasciano la possibilità di formulare l'ipotesi che le infezioni colibacillari, possono in buona parte dei casi ripetere la loro etiologia a germi virulenti che sparsi nell'ambiente, sopratutto nel terreno trovino favorevoli condizioni per conservare la loro vitalità e la loro virulenza. E non mancano tramiti perchè poi questi germi, dotati di forte patogenità, penetrino nell'organismo con le frutta, le verdure, il latte, ecc., fors'anche, in specialissime condizioni, con le acque.

La resistenza del *B. coli* nell'acqua fu studiata da Frankland (2) e più di recente da Mac Naught (8); come gli AA. citati anch'io ho osservato la sopravvivenza del *B. coli*, nell'acqua Marcia non

sterilizzata, per circa tre mesi, durante i quali, prelevato a diversi intervalli, non presentò variazioni rispetto ai suoi caratteri morfologici, biologici, nè rispetto alla sua virulenza.

Ma le condizioni nelle quali tali ricerche furono fatte troppo si allontanano da quelle naturali, perchè a tali esperienze possa essere dato valore igienico, tanto più che Jordan, Russel e Zeit (5) per il *B. typhi*, mettendosi più degli altri ricercatori, in condizioni conformi a quanto avviene in natura, osservarono una sopravvivenza massima di soli 3-4 giorni.

Caratteri biologici del B. coli conservato nel terreno. — Ho voluto ricercare se la lunga permanenza nel terreno potesse modificare alcune delle attività biologiche dei *B. coli* seminati e ciò non era disutile perchè è pur sempre da studiarsi se certe forme atipiche del *B. coli* intestinale non dipendano da diverse condizioni ambiente nelle quali il germe per lungo tempo si è trovato. Studiai quindi per ogni isolamento il comportamento dei germi isolati rispetto alla mobilità, alla produzione di indolo e di triptofane, alla coagulazione del latte e al comportamento sull'agar Drigalski-Conradi, alla produzione di acidi e di gas nei terreni glucosati, e di fluorescenza nei mezzi al rosso-neutro; non ebbi mai ad osservare alcuna variazione, concordemente a quanto per il *B. coli* conservato nel suolo ebbero ad osservare Horrocks (l. c.) e Savage (l. c.).

II. — **Ricerche sul B. coli conservato nei liquidi organici.**

Conservai nelle pipette Roux, chiuse alla lampada, il liquido peritoneale raccolto da cavie agonizzanti o morte per acuta setticemia e il sangue delle stesse, o raccolto per salasso dalla carotide e defibrinato, o prelevato direttamente dal cuore senza defibrinazione. Il materiale venne conservato nel refrigerante. (c[a] 10°).

Ho avuto sempre cura di identificare il contenuto batterico sia del liquido peritoneale, che del sangue, tanto al momento del prelevamento, come nei successivi isolamenti. Ottenni sempre colture pure di *B. coli*, i quali, specialmente per il comportamento della reazione agglutinante, come già ho accennato, erano facilmente identificati con lo stipite inoculato.

Nel liquido peritoneale la vitalità del *B. coli* si conserva per lunghi mesi; alla fine del dicembre 1906 ho avuto ancora rigogliose colture di isolamento da liquido peritoneale raccolto il 17 novembre 1905 da tre cavie inoculate con tre stipiti diversi di *B. coli*.

I germi isolati non presentavano modificazioni nelle loro attività biologiche.

Anche la virulenza dei germi si conserva benissimo in queste condizioni come risulta dalla seguente tabella:

TABELLA IV.

Stipite di *B. coli*	Prelevamento del liquido peritoneale	Virulenza all'epoca del prelevamento	Virulenza dei germi isolati
3	28 settembre 1905	$^1/_{10}$ di ansa normale	I *B. coli* isolati dal liquido peritoneale a più riprese sino al 3 luglio 1906, presentarono una dose minima letale = $^1/_8$ d'ansa.
4	»	»	
3	17 novembre 1905	un'ansa normale	Al 28 dicembre 1906 la virulenza di questi tre stipiti si mantiene ancora immutata.
4	»	»	
2	»	due anse normale	
4	31 marzo 1906	$^1/_2$ ansa normale	Al 28 dicembre 1906 la dose minima letale si conserva a $^1/_2$ ansa normale.

La virulenza adunque dei germi contenuti nel liquido peritoneale si mantiene costante anche per più di un anno, quando la d. m. l. non sia espressa da piccole frazioni di ansa normale, nel quale caso essa può elevarsi di poco.

Mi sembra quindi anche questo un mezzo semplice di conservazione della virulenza, tanto più prezioso per la costanza con cui il titolo della virulenza si mantiene anche per lunghi mesi.

Nel sangue prelevato da animali in preda ad acuta colisetticemia, e conservato in pipette Roux alla temperatura del refrigerante, il *B. coli* rimane vitale per 6-7 mesi, dopo i quali le colture riescono negative. In questo mezzo anche la virulenza diminuisce in breve tempo.

***

Posso quindi concludere che *il terreno sterilizzato è un ottimo mezzo di conservazione della virulenza del* B. coli, *il cui potere patogeno anzi, nella stagione calda, si può esaltare: che il* B. coli, *si conserva a lungo, e virulento, nel liquido peritoneale; invece nel sangue per soli 6-7 mesi, e con progressiva diminuzione della sua virulenza,* quando questi liquidi organici, prelevati da animali in preda ad acuta colisetticemia, vengono conservati nelle condizioni suesposte.

III. — Resistenza del B. coli agli agenti fisici.

Non sembrò cosa superflua portare un nuovo contributo sperimentale sulla resistenza ai più comuni agenti fisici di disinfezione di alcuni stipiti patogeni di *B. coli*, tanto più che le cifre che questa resistenza dovrebbero determinare sono discordanti a seconda dei vari autori; così, per citare un esempio, mentre secondo v. Geuns il *B. coli* ad una temperatura di 59-60° C. resiste solamente per 5′, secondo Fränkel resiste 120′ e Kitasato, Weisser, Chantemesse e Widal lo dànno resistente alla stessa temperatura per 10′-15′-30′.

Azione del calore. — La tecnica seguita è la comune: i fili di seta sterilizzati intrisi nelle brodocolture od in emulsioni delle patine su agar in soluzione fisiologica, venivano esposti per il tempo voluto ai vapori di acqua sviluppantisi a diverse temperature, e poi immersi entro provette di brodo sterile e portate in termostato a 37°. Nelle ricerche col calore secco, i fili disposti in scatole di Petri erano tenuti per vari tempi nella stufa a secco, regolata alla temperatura voluta; furono fatte anche ricerche saggiando la resistenza dei germi distesi in strato sottilissimo su vetrini coproggetti.

I risultati più importanti delle esperienze sono riassunti nelle seguenti tabelle, nelle quali i tempi indicano la minima durata di esposizione che ha impedito lo sviluppo.

Tabella V. — *Azione del vapore fluente.*

Temperatura del vapore fluente	Mezzo di esposizione	Età e qualità della coltura	Limiti di resistenza per i *B. coli*: 2	3	4
50° . . .	filo di seta	brodocoltura di 1 giorno	30′	40′	40′
» . . .	»	brodocoltura di 5 giorni	20′	30′	30′
» . . .	vetrini coproggetti	patina di 1 giorno	30′	40′	40′
60° . . .	filo di seta	brodocoltura di 1 giorno	3′	3′	3′
75° . . .	»	»	1′	1′	1′
» . . .	vetrini coproggetti	patina di 1 giorno	1′	1′	1′
100° . . .	filo di seta	brodocoltura di 1 giorno	30″	30″	30″

TABELLA VI. — *Azione del calore secco.*

Temperatura del vapore fluente	Mezzo di esposizione	Età e qualità della coltura	Limiti di resistenza per i *B. coli*:		
			2	3	4
50° . . .	filo di seta	brodocoltura di 1 giorno	55′	120′	120′
» . . .	»	emulsione di patina di 1 giorno	25′	90′	90′
» . . .	vetrini coproggetti	patina di 1 giorno	oltre 5 ore		
60° . . .	filo di seta	brodocoltura di 1 giorno	30′	30′	30′
» . . .	vetrini coproggetti	patina di 1 giorno	oltre 3 ore		
66° . . .	filo di seta	brodocoltura di 1 giorno	6′	10′	10′
70° . . .	»	»	6′	8′	12′
» . . .	vetrini coproggetti	patina di 1 giorno	90′	120′	120′
100° . . .	»	»	1′	1′	1′

Considerazioni. — L'esame delle cifre suesposte ci permette di dire che diversi stipiti di *B. coli* possono presentare differenze di resistenza all'azione del calore, notevoli specialmente a temperature poco elevate; che al vapore fluente il mezzo di esposizione e la qualità delle colture ha poca importanza, mentre le colture di qualche giorno si dimostrano meno resistenti delle fresche; che il calore secco ha un'azione sterilizzante molto minore del vapore fluente, specialmente quando i germi si trovano distesi in sottile strato su vetrini, mentre le emulsioni di patine in soluzione fisiologica presentano una resistenza minore delle brodocolture.

Fu studiata anche l'azione del calore secco a 60° direttamente sulle provette di sviluppo (brodo-agarcolture) ottenendo risultati a prima vista contradditori. Infatti, mentre in una serie di ricerche le brodocolture dei tre stipiti non erano sterilizzate, neppure dopo un'esposizione prolungata per 2 ore, in una successiva ricerca i germi rimasero uccisi a capo a 90′ ed in un terzo, per i due stipiti 2-3, solamente dopo 45′. Le agarcolture dello stipite 2, sempre meno resistente, furono sterilizzate a calore secco a 60° dopo 45′, mentre lo stipite 3 conservò la sua vitalità anche dopo un'esposizione di 2 ore; per lo stipite 4 avvenne lo stesso fatto osservato per le brodocolture, mentre cioè nelle prime due ricerche il germe resiste ad una esposizione di 1-2 ore, in una terza le agarcolture furono sterilizzate dopo soli 45′.

Questo diverso comportamento delle colture esposte al calore, probabilmente deve essere messo in relazione con le modificazioni e i processi di varia natura che avvengono nei substrati nutritizi durante lo sviluppo dei germi, che certamente non si evolvono sempre con la stessa intensità e che possono variamente influenzare la resistenza e la vitalità dei germi.

Bisogna inoltre considerare che la minore resistenza fu sempre osservata nelle prove fatte posteriormente in ordine di tempo, alla distanza di parecchi giorni, e cioè in quelle colture che avevano subìto un numero di trapianti maggiori (i passaggi erano fatti giornalmente), ed infatti, durante tutte le mie ricerche i germi, a parità di condizioni, apparvero sempre più resistenti dopo l'isolamento dagli animali e nei primi trapianti.

E possibile, a forza di adattamenti, conferire gradualmente al *B. coli* una resistenza maggiore? Partendo da colture in agar dello stipite 4, che esposte al calore secco a 60°, erano sterilizzate dopo 60′, mentre erano ancora capaci di sviluppo dopo 45′, facendo i passaggi giornalmente dalle colture sottoposte alla temperatura limite, che man mano andava aumentando, riuscì, dopo 6 giorni, di ottenere colture resistenti a 60° per 90′, ma al settimo passaggio il limite della resistenza ritornò a 45′.

Il germe, giornalmente sottoposto a questi riscaldamenti non modificò punto alcuna delle sue proprietà biologiche, nè subì danni nel suo potere patogeno; infatti, partendo dal germe isolato dall'animale, dopo 10 passaggi fatti giornalmente, tanto le colture non riscaldate, quanto quelle sottoposte alla temperatura di 60°, diedero le stesse manifestazioni biologiche ed uccisero le cavie con la stessa dose minima letale (3 anse normali).

L'esame delle tabelle permette anche di constatare come i germi prelevati da un'agarcoltura e distesi su un vetrino coproggetti presentano una resistenza molto più forte di quando essi vengono esposti all'azione del calore sullo stesso terreno di sviluppo; mi nacque quindi il dubbio che questa minore resistenza non fosse dovuta alla presenza dei prodotti dannosi alla vitalità e resistenza dei germi accumulatisi nell'agar durante lo sviluppo. All'uopo misi contemporaneamente nella stufa a 60° dei vetrini su cui era disteso il materiale in strato sottile, la agarcoltura da cui questo materiale era stato prelevato e una provetta di agar nuovo sul quale aveva trasportato e disteso parte della patina. Questa prova, che ripetei più volte, dimostrò sempre una maggiore resistenza dei germi distesi sui vetrini, mentre la resistenza delle patine lasciate sull'agar di

sviluppo e di quelle trasportate sull'agar nuovo si dimostrò il più delle volte uguale, ma qualche volta i germi lasciati sull'agar di sviluppo dimostrarono una resistenza minore, in una esperienza anzi di molto inferiore. Non è adunque da escludersi che dall'agar nuovo o di sviluppo, e forse più facilmente in questo, sotto l'azione del calore si formino delle sostanze nocive ai germi derivanti dalle complesse molecole organiche del *substratum* e, per il terreno su cui si sono sviluppati i germi, anche derivate dall' azione dei germi stessi o come effetto del loro ricambio. Inoltre va notato che dalle agarcolture messe in stufa a 60° si sprigiona sempre del vapor acqueo, così che per queste non è più il caso di parlare di calore secco, che, come è noto, ha azione meno dannosa del calore umido.

Azione dell'essiccamento. — Le palline di vetro ed i fili di seta intrisi nelle brodocolture o nelle emulsioni di patine ed i vetrini su cui erano distesi i germi, messi dentro scatole di Petri, vennero collocati in essiccatori Scheibler a cloruro di calcio, tenuti al riparo della luce diffusa. Dopo un tempo determinato i campioni di prova furono messi dentro provette di brodo, poste poi a svilupparè nel termostato a 37°.

TABELLA VII. — *Azione dell'essiccamento.*

Mezzo di esposizione	Età e qualità della brodocoltura	Durata della esposizione	Sviluppo per gli stipiti		
			2	2	4
Fili di seta (1ª ricerca). .	Brodocoltura di 1 giorno	15 giorni	—	—	—
Id. (2ª ricerca). .	Id.	80 »	+	+	+
Palline di vetro	Id.	15 »	—	+	—
Vetrini	Agar di 1 giorno	85 »	+	+	+
Id.	Agar di 6 giorni	85 »	+	+	+
Fili di seta	Emulsione di patina di 1 g. in soluzione fisiol.	25 »	—	+	+
		38 »	—	—	+
Id.	Soluzione fisiologica sterile di 1 giorno	8 »	—	—	+
		15 »	—	—	—
Id.	Acqua di fonte sterile, sviluppo di 1 giorno	10 »	—	—	+
		17 »	—	—	+
		30 »	—	—	—
Id.	Acqua distillata sterile, sviluppo di 1 giorno	10 »	+	—	+
		17 »	—	—	+
		30 »	—	—	+

Anche da questa prova risulta che, entro certi limiti, la resistenza dei vari stipiti è diversa e che essa non è gran che influenzata dal modo di esposizione, per quanto resistano meglio i germi distesi in sottile strato nei vetrini. Strana è la notevole differenza di resistenza osservata per tutti e tre gli stipiti conservati su fili di seta in due ricerche; forse il fatto si potrebbe spiegare con l'ammettere qualche effetto debilitante intervenuto nello sviluppo delle brodocolture che hanno servito per le prime esperienze.

Si ricordi del resto quanto siano contraddittori i risultati ottenuti in questo campo da diversi ricercatori, dei quali alcuni (Billing e Peckham, Buchner) dicono il *B. coli* resistente all'essiccamento fino a 5 mesi, mentre per altri (Walliczeck, p. es.) morirebbe relativamente presto.

I germi sviluppati su agar, in soluzione fisiologica, in acqua di fonte e sterilizzata, presentano una resistenza minore di quelli sviluppati nel brodo. Il disseccamento non produce alcuna modificazione delle proprietà biologiche e della virulenza.

Ho ricercata anche la resistenza del *B. coli*, lasciato nelle condizioni ambienti, esposto alle variazioni di temperatura e alla luce diffusa. In queste condizioni, il *B. coli*, su fili di seta, sopravvisse per 35 giorni, le brodocolture e le agarcolture erano ancora vitali dopo 7 mesi; i germi invece conservati in semplice soluzione fisiologica erano morti dopo 90 giorni.

Azione della luce solare. — I fili di seta, i vetrini contenuti in scatole di Petri, le provette di sviluppo furono esposte alla luce solare diretta.

TABELLA VIII. — *Azione della luce solare.*

Mezzo di esposizione	Età e qualità delle colture	Temperatura della luce solare nel momento della esperienza	Durata della esposizione	Sviluppo per gli stipiti		
				2	3	4
Filo di seta . .	Brodocoltura di 1 giorno	25° C.	6 h.	—	—	+
Id. . .	Id.	35° »	4 »	—	+	—
Id. . .	Acqua peptonizzata e salata di 1 giorno	27° »	6 »	+	—	+
Id. . .	Id.	35° »	4 »	—	—	—
Id. . .	Soluzione fisiologica di 1 giorno	27° »	6 »	—	—	—
Id. . .	Id.	35° »	4 »	—	—	—
Id. . .	Emulsione di patina	23° »	5 h. 30′	—	—	+
Id. . .	Id.	35° »	4 h.	—	—	—
Vetrini	Agar di 1 giorno	23° »	6 h. 45′	+	+	+
Id. . .	Id.	35° »	4 h.	—	+	+
Provetta di sviluppo	Brodo di 1 giorno	31° »	6 »	+	+	+
Id. . .	Id.	43° »	6 »	—	—	—
Id. . .	Agar di 1 giorno	31° »	6 »	+	+	+
Id. . .	Id.	43° »	6 »	—	—	—
Id. . .	Soluzione fisiologica	31° »	6 »	—	—	—
Id. . .	Id.	43° »	3 h. 30′	—	—	+
Id. . .	Acqua di fonte	31° »	6 h.	—	—	+
Id. . .	Id.	43° »	3 h. 30′	—	—	—
Id. . .	Acqua distillata	31° »	6 h.	—	—	—
Id. . .	Id.	43° »	3 h. 30′	—	—	—

Anche per l'azione della luce solare resta confermata la maggior resistenza dei germi distesi su vetrini in patina sottile. Inoltre resistono maggiormente le colture sviluppate in brodo e su agar che non quelle sviluppate in acqua di fonte o distillata o in solu-

zione fisiologica. La luce solare diretta è capace di uccidere il *B. coli*, ma quando agisca per un tempo piuttosto lungo e naturalmente la sua azione sterilizzante è in ragione diretta della sua temperatura.

Tutte queste ricerche portano alla conclusione che *diversi stipiti presentano anche diverse resistenze, pur sempre entro certi limiti, agli agenti fisici e che uno stipite che verso un dato agente si dimostra poco o molto resistente, si comporta in modo presso a poco eguale verso tutti gli altri agenti fisici.*

Conclusioni.

I. Il *B. coli* conserva per più di dodici mesi la vita e la virulenza, senza variazione alcuna delle sue principali proprietà biologiche, nel terreno di giardino sterilizzato, esposto alle influenze circumambienti e stagionali, le quali anzi, durante la stagione estiva, favoriscono l'esaltazione del potere patogeno. Alcuni individui però, dopo parecchi mesi di permanenza nel terreno, possono diminuire o perdere del tutto la loro virulenza.

II. Anche il liquido peritoneale prelevato de cavie inoculate con *B. coli* virulenti, è un buon mezzo di conservazione della vitalità e della virulenza, il cui titolo si può in tal modo mantenere costante per parecchi mesi.

III. Nel sangue prelevato da cavie in preda a acuta colisetticemia il *B. coli* resiste per 6-7 mesi, durante i quali diminuisce progressivamente il suo potere patogeno.

IV. La resistenza del *B. coli* agli agenti fisici è variabile, entro certi limiti, da stipite a stipite ed è in rapporto con l'età e la qualità delle colture e col mezzo di esposizione.

LAVORI CITATI.

1. De Blasi. *Intorno al passaggio degli anticorpi nel latte*, ecc. Questi Annali, vol. XVI, p. 545.
2. L. Frankland. *Ueber das Verhalten des Typhusbac. und des Bac. coli commune im Trinkwasser*. Zeitschr. f. Hyg., XIX, p. 393.
3. Grancher et Deschamps. *Recherches sur le B. typhique dans le sol*. Arch. de méd. exp. et d'anat. path., 1899.
4. Horrocks. Journ. of Royal Army Medical Corps I, cit. in Mac Conkey. Journ. of Hyg., 1905, p. 333.
5. Jordan, Russell a. Zeit. *The longevity of the typhoid bacillus in water* Journ. of infect. Diseases I, p. 641.
6. Karlinski. *Untersuch. über das Verhalten von Typhusbac. im Boden*. Arch. f. Hyg., XIII.

7. Levy u. Kayser. *Ueber die Lebensdauer von Typhusbacillen die in Stuhle entleert wurden.* Centralbl. f. Bact., XXXIII, p. 489.
8. Mac Naught. *The duration of vitality of B. coli communis in various Waters, and in sewage.* Journ. of the Roy. Army Med. Corps V., p. 95.
9. Martin. *Preliminary Report on the growth of the Typhoid Bacillus in Soil.* Twenty-sixth annual Rep. of the local Govern. Board, 1896-97.
10. Paladino-Blandini. *Influenza del suolo sulla virulenza del Vibrione colerigeno.* Giorn. internaz. delle scienze mediche, XXVI, fasc. 9.
11. Pfahl. *Vergleichende Untersuch. über die Haltbarkeit der Ruhrbac. u. der Typhusbac. ausserhalb des menschlichen Körpers.* Zeit. f. Hyg. XL, p. 555.
12. Robertson. *Notes on an experimental investigation into the growth of Bac. typhosus in soil.* British medical Journ. 1898, gennaio.
Id. *Das Eindringen der Bakterien und speziell des Typhusbac. in die Tiefe.* British med. Journ., 1898, agosto.
13. Rodet et Lagriffoul. C. R. de la Soc. de Biol., v. LIX, pp. 555-643.
14. Rullmann. *Ueber das Verhalten des in Erdboren eingesäten Typhusbac.* Centralbl. f. Bakt., XXX, p. 321.
Id. *Id.* Centralbl. f. Bakt., XXXVIII, p. 380.
15. Savage. *Bacteriological examination of tidal mud*, etc. Journ. of Hyg., 1905, p. 149.

Laboratorio micrografico municipale di Messina

Le funzioni della milza nella immunità e sieroterapia

per il dott. TULLIO MAZZEI.

(Con la Tav. XI).

I primi studî sulla funzione della milza furono diretti a stabilire i rapporti di quest'organo con la sanguificazione.

Neumann (1) per il primo negò la grande importanza che si annetteva alla milza nella funzione ematopoietica e da ricerche istituite sul proposito risultò che la milza non fabbrica globuli rossi nè nella vita fetale, nè nella vita estrauterina.

Contemporaneamente Picard e Malassez (2) hanno osservato che nei cani la estirpazione della milza provoca una diminuzione del quantitativo di emoglobina e non del numero dei globuli rossi, che ritornano presto alla cifra normale; e Bizzozero e Salvioli (3) constatarono la diminuzione dell'emoglobina subito dopo l'atto operativo, mentre per Tizzoni e Fileti (4) dopo la splenectomia si verifica un aumento della percentuale di emoglobina prima del ritorno alla cifra normale.

Seguono quindi altre ricerche di Tizzoni (5, 6, 7), Winogradow (8), Grigorescu (9, 10), Vulpius (11), Bottazzi (12), Gabbi (13, 14), sulle modificazioni del sangue dopo la splenectomia, ed è ora ritenuto da tutti (Luciani, 15) che la milza non solo è un organo ematopoietico ma anche emolitico.

Altri studî furono indirizzati a stabilire le funzioni della milza nelle infezioni e nella guarigione; si è voluto ricercare cioè l'azione espletata da quest'organo nella produzione delle sostanze vaccinanti e curative naturali ed anche in questo campo non mancano le ricerche.

Kourloff (16), in una prima serie di esperienze, inoculò a dei conigli splenectomizzati il carbonchio ematico, il mal rosso dei suini, il colera dei polli, lo streptococco dell'eresipela, e ne dedusse che la parte della milza nella lotta fra l'organismo ed i parassiti invadenti non è per nulla più impor-

tante di quella di tutti gli altri organi. Questi risultati vennero confermati in altra serie di 11 esperienze sopra conigli e con microbi poco o niente patogeni per questi animali.

Bardach (17) inoculando carbonchio ai cani ha constatato che su 25 animali splenectomizzati ne morirono 19, mentre sopra altri 25 di controllo ne morirono solamente 5, egli ritiene che la milza ha una parte interessante nella lotta contro la infezione e per maggiore sicurezza ha creduto utile ripetere le esperienze in animali più sensibili al carbonchio che non i cani (18) ottenendo gli stessi risultati; infatti, inoculando culture attenuate di carbonchio nelle vene a 35 conigli normali non ha osservato in alcuno la morte, mentre in altrettanti smilzati ne morirono 26.

Werigo (19) esperimentando su cavie venne a conclusioni tutto affatto diverse da quelle di Bardach, mentre Soudakewich (20) inoculando la febbre ricorrente alle scimmie ha osservato che la lotta contro gli spirilli si compie esclusivamente nella milza, dove sono inglobati e distrutti. L'organismo splenectomizzato presenta un mezzo favorevole alla coltura degli spirilli, questi si propagano liberamente senza che, nè i gangli, nè il midollo delle ossa, nè il fegato, nè le stesse cellule endoteliali dei vasi che sono in comunicazione intima con gli spirilli, possano difenderlo dai parassiti che invadono sempre più il sangue.

Courmont e Duffau (21) inoculando lo stafilococco piogeno, lo streptococco ed il bacillo piocianeo hanno osservato che i conigli splenectomizzati, dopo 2 a 25 giorni, si mostrano molto più sensibili dei sani all'azione del bacillo piocianeo e dello stafilococco; i primi animali muoiono in poche ore, mentre i secondi sopravvivono molto tempo ancora e si salvano. Secondo queste esperienze quindi la milza riesce utile nella difesa dell'organismo solo contro i primi due germi e non per il terzo.

Blumreich ed Jacoby (22) saggiando l'azione del bacillo della difterite nelle cavie splenectomizzate osservarono che esse si comportano riguardo a questo bacillo come le cavie sane. Sperimentando invece col piocianeo ottennero risultati diversi, e mentre di 12 cavie normali 8 morirono ed una fu gravemente ammalata, di 14 cavie smilzate una sola ebbe a soccombere; e risultati analoghi ottennero con le iniezioni endoperitoneali di vibrione colerico: su 15 animali normali 13 morti, su 18 smilzati soltanto 4. Riguardo all'azione dei prodotti tossici (difterite, piocianeo) non furono notate considerevoli differenze fra le cavie che avevano subìto l'ablazione della milza e le cavie sane.

Altre ricerche furono indirizzate a studiare le proprietà specifiche del siero di sangue di animali splenectomizzati.

Tizzoni e Cattani (23) esperimentando su conigli vaccinati contro il tetano, hanno osservato che il siero di sangue di questi animali perde in parte od in tutto il potere immunizzante se viene tolta loro la milza.

Dalle ricerche di Montuori (24) risulta che la milza invia normalmente al sangue una sostanza dotata di potere antibatterico e globulicida, e che quando si pratica la splenectomia il sangue dell'animale perde il potere battericida verso il 14° giorno e lo riacquista solo dopo 3 o 4 mesi dallo esperimento.

Blumreich ed Jacoby (22) hanno osservato che animali, iniettati con culture di piocianeo sviluppate in sangue di animali smilzati, presentarono una maggiore resistenza ed alcuni di essi sopravvissero all'infezione. Il sangue delle cavie smilzate avrebbe dunque un'azione battericida sul piocianeo, mentre, come risulta da esperienze analoghe, non ha alcuna azione sulla tossina dello stesso germe.

Jatta (25) ha osservato che due o tre giorni dopo l'inoculazione del B. del tifo, il potere agglutinante è notevolmente più forte nella milza che nel siero; in seguito però il potere agglutinante del siero è più grande.

Capogrossi (26) ritiene che la milza nella cavia non ha diretta influenza nella formazione delle emoagglutinine ed emolisine e che la produzione delle emoagglutinine è diminuita in principio per la mancanza dell'organo, ma in seguito questo difetto viene compensato.

Rath (27) studiando l'importanza degli organi ematopoietici nella formazione delle agglutinine, ha osservato che il valore agglutinante degli animali smilzati era uguale a quello degli animali sani.

Infine Mills (28) ha cercato di stabilire l'influenza che la polpa splenica può esercitare sul B. del tifo. Egli è venuto alla conclusione che la polpa splenica fresca ed asettica posta a contatto con un B. del tifo di debole virulenza, ne esalta sia immediatamente che dopo un certo tempo il potere patogeno, rendendolo capace di uccidere le cavie in 12 ore. L'azione esercitata dalla polpa splenica sul B. del tifo è dovuta, secondo l'autore, al protoplasma delle cellule e non al liquido intercellulare, i cui effetti sono nulli; e la polpa splenica si comporterebbe come un fermento non figurato, non limitandosi solo a mettere le tossine in libertà, ma agendo su di esse per renderle più attive.

Nello intento di poter stabilire le funzioni della milza nel meccanismo della immunità e sieroterapia ho istituito delle ricerche con diversi germi su animali sani e splenectomizzati, studiandone per ogni infezione il potere spiccato che il siero di sangue di animali vaccinati espleta in ogni singola malattia, ricerche fino ad oggi non fatte.

Infezione carbonchiosa.

Per le ricerche sul carbonchio ho utilizzato i conigli, animali abbastanza sensibili a tale infezione. Il metodo di immunizzazione fu quello ordinario praticato con i due vaccini Pasteur e successiva inoculazione di culture più attive. Trascorsi 8 giorni dalla inoculazione del secondo vaccino, si aumentò in tutti gli animali, man mano, il grado di immunità iniettando sotto cute quantità crescenti di culture in brodo di carbonchio virulentissimo, tale da provocare nei conigli la morte in 36-48 ore se inoculato sotto cute nella quantità di 1 cmc. La prima dose di cultura attiva iniettata, fu di un decimo di cmc., e tutti gli animali non presentarono nè sintomi locali, nè generali, pure furono tenuti in osservazione

per un periodo di 5 giorni e solo allora s'inocularono 2 decimi di cmc. di cultura di 24 ore; con questo graduale aumento, in circa due mesi, furono preparati gli animali a sopportare la dose di 2 cmc. di cultura non trattata.

Non ho usato il metodo di immunizzazione proposto da Casagrandi per mezzo del succo di organi carbonchiosi ricavato con la pressa di Buchner (29) o con i filtrati alla Chamberland (30) di culture in albuminato alcalino e quello di Bochicchio (31) per mezzo di filtrato di prodotti leucocitici, perchè di lunga preparazione; nè si è ricorso alla pronta vaccinazione proposta prima da Sclavo (32) e poi da Sobernheim (33) d'iniettare nelle vene piccole dosi di siero anticarbonchioso solo o aggiunto a culture mediocremente virulente, perchè oggetto di altre ricerche che riferirò in seguito.

Credo utile ricordare qui che Serafini e Erriquez (34) non hanno ottenuto la guarigione o il ritardo della malattia inoculando a conigli, cavie e topi, culture di carbonchio e sangue o siero di cani, ratti, polli, rane, rospi, ramarri, testuggini, ed analoghi risultati negativi ottennero Enderlen (35) e Petermann (36) col siero di sangue di cane, e Roudenko (37) con il siero di rana; mentre Ogata e Jasukara (38) trovarono che il sangue ed il siero di rane, ratti, cani, animali refrattari al carbonchio, iniettato agli animali suscettivi determina in essi l'immunità; Behring (39) con iniezioni di siero di ratti riuscì a salvare i topi dal carbonchio e Rondeau (40) facendo trasfusioni di sangue di cane nei montoni riuscì qualche volta a preservarli dal carbonchio.

Questi risultati disparati furono ben chiariti dalle ricerche di Hankin (41), Metchnikoff e Roux (42), i quali hanno osservato che il potere preservativo del siero di sangue dei ratti contro il bacillo del carbonchio non è più attivo se viene inoculato in un sito molto lontano dal germe, e che i casi di guarigione si debbono al fatto che il siero dei ratti messo in immediato contatto con i bacilli del carbonchio esercita il suo potere spiccatamente battericida.

Ultimamente Cacace (43) ha osservato che bastano piccole dosi di siero di volpe per proteggere le cavie dalla infezione carbonchiosa, e che una volpe assoggettata ad un digiuno di 5 giorni ha sopportato l'inoculazione intraperitoneale di 5 cmc. di cultura virulenta ed altre due iniezioni di 8-10 cmc. Giusti (44) ha controllato le esperienze di Cacace ed ha visto che il siero di sangue di volpe non possiede alcun potere battericida *in vitro* e che l'inoculazione di siero di volpe, praticata alle cavie sotto cute ed ai conigli nelle vene, non riesce a salvare questi animali dalla inoculazione sottocutanea di una cultura virulenta di carbonchio. Resta però assodato dalle ricerche di Giusti che la volpe possiede una immunità naturale verso l'infezione carbonchiosa.

***

I conigli vaccinati da me furono 30, di cui 15 *splenectomizzati* e 15 *normali* e la vaccinazione fu incominciata sette giorni dopo la splenectomia, tempo utile per potersi rimettere completamente gli animali dall'operazione.

Il salasso fu praticato dalla giugulare; scoperta ed isolata la vena s'infigge un grosso ago-cannula, innestato ad una siringa di Roux, della capacità di 20 cmc.; per maggiore sicurezza si lega l'ago alla porzione periferica della vena e si aspira lentamente il sangue man mano che la vena se ne riempie.

Il sangue versato subito in grossa provetta si conserva in ghiacciaia e, distaccato il siero, si aspira e conserva in boccette sterilizzate a secco.

Di questo siero furono ricercate le proprietà spiccate che possiede il siero-anticarbonchioso, il *potere immunizzante* ed il *curativo*.

I Esperienza.

Potere immunizzante. — A diversi conigli furono inoculati, nella vena marginale dell'orecchio, da 2 a 10 cmc. di siero, e dopo 6-24 ore s'inocula sotto la cute dell'addome 1 cmc. di cultura in brodo di carbonchio.

Provenienza e quantità del siero inoculato	Animale	Inoculazione della cultura	Esito
Da conigli splenectomizzati:			
2 cm^3	Coniglio di circa 1500 gr.	Dopo 12 ore	Morte
» »	»	» 24 »	»
5 »	»	» 12 »	»
» »	»	» 24 »	»
10 »	»	» 12 »	»
» »	»	» 24 »	Sopravvisse
Da conigli normali:			
2 »	»	» 12 »	Morte
» »	»	» 24 »	»
5 »	»	» 12 »	»
» »	»	» 24 »	Sopravvisse
10 »	»	» 12 »	Morte
» »	»	» 24 »	»

Le prime ricerche sul potere preservativo del siero anticarbonchioso furono fatte da Sclavo (45, 46), egli ha visto che 2 cmc. di siero prove-

niente da un montone immunizzato preservano dalla morte i conigli inoculati, dopo 12-24 ore, con 1 cmc. di cultura virulenta.

Tale proprietà specifica fu comprovata in seguito (47) nelle pecore, iniettando nelle vene quantità relativamente piccole di siero; di questo processo d'immunizzazione si servì, in seguito, nelle sue ricerche nelle pecore il Sobernheim (48), che prima (49) non era riuscito a premunire i conigli con siero di pecore immunizzate con alte dosi di culture di carbonchio.

Così Ottolenghi (50) è riuscito ad immunizzare le cavie con inoculazioni endoperitoneali di siero anticarbonchioso Sclavo, e Casagrandi (51) immunizzò i conigli con siero di pecore inoculate con la sostanza coagulante estratta dagli organi di animali in preda all'infezione carbonchiosa, con l'inoculazione (52) di filtrati di brodo culture di carbonchio in albuminato alcalino e con gli estratti (53) in soluzione fisiologica di organi di animali infetti, prima spremuti a 300-400 atmosfere.

II Esperienza.

Potere curativo. — In queste ricerche la quantità di cultura iniettata fu di 1 cmc. e sempre sotto la cute dell'addome, mentre il siero fu inoculato nelle vene nella quantità varia da 2 a 10 cmc.

Provenienza e quantità del siero inoculato	Animale	Inoculazione del siero (tempo trascorso dall' inoculazione della cultura)	Esito
Da conigli splenectomizzati:			
2 cm³	Coniglio di circa 1500 gr.	Dopo 6 ore	Morte
» »	»	» 12 »	»
» »	»	» 24 »	»
5 »	»	» 6 »	»
» »	»	» 12 »	»
» »	»	» 24 »	»
10 »	»	» 6 »	Sopravvisse
» »	»	» 12 »	Morte
» »	»	» 24 »	»
Da conigli normali:			
2 »	»	» 6 »	«
» »	»	» 12 »	»
» »	»	» 24 »	»
5 »	»	» 6 »	Sopravvisse
» »	»	» 12 »	Morte
» »	»	» 24 »	»
10 »	»	» 6 »	»
» »	»	» 12 »	Sopravvisse
» »	»	» 24 »	Morte

Sclavo per primo (54) cercò l'azione curativa del siero anticarbonchioso ed ha potuto salvare i conigli inoculati dopo 6-12 ore dalla inoculazione di colture, mentre conigli inoculati dopo 18-24 ore anche con 10 cmc. di

siero morirono tutti. In queste prove l'inoculazione del siero fu praticata sotto cute e più tardi (55) ha ottenuto migliori risultati con le iniezioni endovenose di quantità relativamente piccole di siero, proteggendo con 1-2 cmc. di siero, conigli inoculati con dosi elevate di culture di carbonchio portate al massimo di virulenza ed in considerazione di tali risultati egli consiglia nei casi di grave infezione carbonchiosa nell'uomo l'inoculazione del siero nelle vene (56).

L'azione curativa e battericida contro il carbonchio fu pure conferita al siero di sangue dei conigli da Casagrandi oltre che nei modi sopra ricordati (57), anche con inoculazione di estratti di leucociti disgregati, seguita dalla iniezione di estratti in soluzione fisiologica del succo di organi infetti, e Bochicchio (58) ha potuto esaltare nelle cavie il potere battericida del sangue inoculando a questi animali il filtrato di prodotti leucocitici dopo tenuti a contatto con culture di carbonchio.

Essendo riuscite incerte le prime prove perchè ai conigli non è facile conferire una immunità elevata e duratura con le inoculazioni di culture attenuate, anche seguite da grandi quantità di culture attivissime, ho pensato immunizzare i conigli inoculando nelle vene il siero anticarbonchioso Sclavo, preparato dall'Istituto sieroterapico milanese.

Questo metodo d'immunizzazione, per il minor tempo che richiede e per gli effetti sicuri, riusciva a priori molto più adatto alle mie ricerche potendosi vaccinare gli animali poco tempo dopo la splenectomia; mentre nelle prime esperienze erano trascorsi circa due mesi, fatto che poteva rendere poco attendibili i risultati, essendo noto che le funzioni della milza sono supplite e vicariate molto presto da altri organi linfopoietici: Landois (59), Luciani (60), Gabbi (61).

I Esperienza.

Potere immunizzante. — Ad un numero di 4 conigli normali e 4 splenectomizzati si inocula nelle vene 10 cmc. di siero anticarbonchioso. Negli animali smilzati la prima inoculazione fu praticata 4 giorni dopo la splenectomia e nella quantità di 2 cmc., il resto venne iniettato in due volte alla distanza di tre giorni ciascuna nella dose di 4 cmc. a volta.

Ogni animale, dopo 12 giorni dalla splenectomia e dopo 6-12-18-24 ore dall'ultima inoculazione di siero, riceve sotto cute 1 cmc. di cultura in brodo come nel quadro seguente.

Quantità di siero inoculato	Animale	Inoculazione della cultura	Osservazioni
10 cm³	Coniglio smilzato	Dopo 6 ore	Morte
10 »	Id.	» 12 »	Id.
10 »	Id	» 18 »	Id.
10 »	Id.	» 24 »	Id.
10 »	Coniglio normale	» 6 »	Sopravvive alla splenectomia (*a*)
10 »	Id.	» 12 »	Id.
10 »	Id.	» 18 »	Id.
10 »	Id.	» 24 »	Id.

(*a*) I conigli sani furono smilzati dopo 48 ore dalla inoculazione della cultura.

II Esperienza.

Potere curativo. — Anche in queste esperienze furono utilizzati 8 conigli, di cui 4 smilzati e 4 normali. L'inoculazione sottocutanea di 1 cmc. di cultura in brodo fu praticata nei primi, dopo 5 giorni dalla splenectomia.

Il siero venne in tutti iniettato in una volta nella quantità di 10 cmc. per iniezione intravenosa, e dopo 6-12-18-24 ore dalla inoculazione della cultura.

Un coniglio di controllo muore in 76 ore.

Quantità di siero inoculato	Animale	Inoculazione del siero (tempo trascorso dalla inoculazione della cultura)	Osservazioni
10 cm³	Coniglio smilzato	Dopo 6 ore	Morte
10 »	Id.	» 12 »	Id.
10 »	Id.	» 18 »	Id.
10 »	Id.	» 24 »	Id.
10 »	Coniglio normale	» 6 »	Sopravvive alla splenectomia (*a*)
10 »	Id.	» 12 »	...
10 »	Id.	» 18 »	...
10 »	Id.	» 24 »	...

(*a*) I conigli normali furono smilzati dopo 48 ore dalla inoculazione del siero.

Da queste esperienze si vede che i conigli splenectomizzati, sebbene avessero ricevuto la stessa quantità di siero anticarbonchioso che i conigli normali, non resistono alla inoculazione di culture virulente; mentre i conigli normali splenectomizzati dopo 48 ore dalla inoculazione del siero o della cultura sopravvissero tutti; ciò fa pensare che l'immunizzazione artificiale nell'organismo si compie in brevissimo tempo.

Per rendermi ragione di questa differenza di risultati ho esaminato la pelle [osservazione già fatta da Sclavo (62), Marchoux (63), e Nittis (64)], nel punto d'innesto 48 ore dopo l'inoculazione della cultura o del siero curativo, e posso dire che l'esame microscopico e batteriologico presenta delle differenze rimarchevoli nei diversi animali.

Dalla cute dei conigli smilzati si hanno preparati ricchi di bacilli carbonchiosi e le culture sviluppatesi rigogliosamente non hanno perduta la virulenza primitiva; mentre rari sono i bacilli nel punto di innesto dei conigli normali e le culture si sviluppano lente e molto attenuate, trasmettendo questo potere nei passaggi successivi.

Questo diverso modo di reagire da parte dell'organismo animale è evidente nelle figure 1ª e 2ª.

Nella sezione di cute di animali splenectomizzati si vede l'infiltrazione e moltiplicazione dei bacilli, senza alcuna reazione dei tessuti che si lasciano invadere come nei conigli che non hanno ricevuto alcuna iniezione di siero anticarbonchioso. In questi animali le ghiandole linfatiche vicine al punto d'innesto contengono molti bacilli e se si schiacciano in un bicchiere e si disseminano in agar a becco di clarino si hanno culture rigogliose e virulente, come dal sangue del cuore di animali morti per infezione naturale.

Nella sezione di cute di conigli normali, rari bacilli si vedono *in sito* ed alcuni non assumono uniformemente il colore violetto; qui la reazione dell'organismo è evidente per la presenza di numerosi leucociti, e le culture di ghiandole linfatiche prossimiori al punto di innesto riescono sterili, come sterili rimangono le culture della milza estirpata, sebbene in quest'organo è possibile vedere qualche raro bacillo come nella figura 3ª.

Da tutto ciò risulta chiara l'*importanza della milza nell'infezione carbonchiosa*. Quest'organo mantiene stabile il potere difensivo di fronte alla infezione, aumentando il potere fagocitico e stimolando la produzione degli elementi battericidi invocati da Sclavo (65), e di sostanze specifiche antiproteiniche ed antiistoniche volute da Casagrandi (66); mentre l'azione del sistema linfatico, così utile nel *microbismo latente* [Phisalix (67), Perez (68), Manfredi e Viola (69), Simoncini (70)] non basta da solo nella infezione carbonchiosa.

I risultati di queste esperienze collimano con quelli di Bardach (71) sul meccanismo dell'infezione carbonchiosa e con quelli di Aujeszky (72), il quale ha osservato, che conigli inoculati 3-6 giorni prima dell'infezione con emulsione di milza in soluzione fisiologica, resistono alla infezione carbonchiosa nella proporzione del 75 %, e quelli che la contraggono muoiono più tardi dei controlli.

Dalle mie esperienze risulta pure che il fagocitismo [Metschnikoff (73)] non è il solo mezzo di cui dispone l'organismo nella immunizzazione, e che anzi questo si espleta come fenomeno secondario e solo quando altri prodotti dell'organismo hanno favorevolmente agito, diversamente non potremmo spiegarci la morte dei conigli splenectomizzati in cui la fagocitosi poteva espletarsi benissimo come negli altri animali sani, che avevano subìto lo stesso trattamento profilattico e curativo.

In appoggio di questi risultati ricordo che Pfeiffer e Marx (74-75) in animali immunizzati contro il colera hanno osservato che i leucociti contenevano sempre un piccolo potere immunizzante, mentre altri organi e specie la milza contenevano quantità considerevoli di anticorpi, anche quando il siero non dimostrava la più piccola azione immunizzante; e Deutsch (76) ha osservato nelle cavie trattate con bacilli di tifo, che la milza possedeva sempre un alto potere immunizzante.

Anche per il bacillo del carbonchio non mancano osservazioni sul potere agglutinante del siero di sangue di alcuni animali.

Gengou (77) prima e poi Casagrandi (78) studiarono l'agglutinazione del B. carbonchioso con diversi sieri, e dalle loro osservazioni risulterebbe che il siero di sangue dell'uomo agglutina in proporzioni maggiori di quello di altri animali; Lambette e Maréchal (79) hanno constatato che il siero dell'uomo normale agglutina il B. del carbonchio qualche volta anche con diluizioni di 1:500, fatto che secondo questi AA. ci deve mettere in guardia contro la diagnosi di carbonchio nell'uomo, fondata sul potere agglutinante del siero.

Casagrandi (80) ha osservato che inoculando a cavie e conigli estratti di milza sana, il potere agglutinante si eleva per il siero di cavia e rimane costante nel rapporto di 1 a 20, e per quello del coniglio di 1 a 30; inoculando in questi animali estratti di milza carbonchiosa questo potere si eleva rispettivamente a 1:40-1:50, e raggiunge il massimo di 1:50-1:80 nelle cavie inoculate con estratti leucocitici di conigli immunizzati. L'aumento del potere agglutinante verso il B. carbonchioso fu osservato anche da Bochicchio (81), inoculando nelle cavie il filtrato di prodotti leucocitici dopo tenuti a contatto con culture virulente di carbonchio.

Infezione tifosa.

In considerazione che il B. del carbonchio non si presta bene alla osservazione del fenomeno di agglutinazione, e che non si può conferire un alto potere agglutinante agli animali anche con la iniezione di estratti di milza carbonchiosa, ho preferito scegliere per queste ricerche il B. del tifo e come animale la cavia.

Bitter (82) immunizzò conigli servendosi di culture in brodo addizionato con il 5 % di glicerina, concentrato nel vuoto a 30° fino ad $^1/_{10}$ del volume primitivo. Stabilita prima la dose minima mortale con iniezioni endovenose di $^2/_{10}$-$^3/_{10}$ di cmc. nelle cavie, immunizzò i conigli con iniezioni settimanali di questo liquido a dosi progressivamente crescenti da $^1/_{10}$ ad 1 cmc.

Sieri antitossici hanno pure ottenuto, inoculando diverse quantità di culture sterilizzate a cavie, conigli e montoni, Sanarelli (83-84), Peiper (85), Pfeiffer (86), Pfeiffer e Kolle (87). Questi ultimi tentarono l'immunizzazione contro l'ileo-tifo nell'uomo, iniettando alcuni individui con una miscela di brodo comune e di cultura di tifo in agar; 1 cmc. del liquido iniettato conteneva 0.002 di cultura, di cui bastavano 0.0005 di cmc. per uccidere una cavia di 300 gr., se iniettato nel peritoneo.

Dopo le ricerche di Widal (88) sul potere agglutinante del siero di sangue dei tifosi, numerosi e solleciti lavori si seguirono, fra i quali quelli dello stesso Widal (89), Widal e Sicard (90-91), Bebi (92), Comba (93), Courmont (94), Pugliesi (95), Maragliano (96), Bandi (97), Brancati (98), Bertarelli (99), Migliorato (100), Biffi e Galli (101), Silvestrini e Castellani (102) e molti altri, nello intento non solo di controllare il fenomeno segnalato da Widal, ma anche di suggerire una tecnica esatta e con risultati attendibili.

Mills (103) consigliò di tenere presente la virulenza della cultura che si adopera, essendo tardiva la prova con culture molto virulente, Stern (104-105) trovò che il siero di sangue di individui sani agglutina il B. del tifo di 1:10, Du Mesnil de Rochemont (106) consiglia una diluizione di 1:25, Haedke (107) e Siegert (108) di 1:33, Von Oordt (109), Casagrandi (110), Valagussa (111), Fiocca (112) di 1:40, Tomaselli e Brancati (113) di 1:50, Scheffer (114-115) di 1:100; si è convenuti infine di dare importanza solo a quel siero che agglutina con diluizioni superiori a 1:50: Gabbi (116) ed altri.

Il potere agglutinante oltre che nel siero di sangue di tifosi si è cercato pure in animali immunizzati contro il tifo, e Valagussa (117) ha conferito al siero di sangue di diversi animali un forte potere agglutinante inoculando i prodotti plasmatici dei B. del tifo ed i prodotti di macerazione di essi. Deutsch (118) si è servito di una cultura di tifo che alla dose di $^1/_7$-$^1/_6$ di coltura in agar inoculata nel peritoneo, uccideva le cavie di 300-400 gr. in 8-12 ore; egli ha visto che la iniezione intraperitoneale di una cultura tifica riscaldata, provoca nella cavia l'apparizione del potere

agglutinante nel siero, che gli organi linfoidi ne contengono quantità variabili senza raggiungere il valore del siero, e che la splenectomia precedente la iniezione immunizzante non impedisce la formazione delle agglutinine, mentre praticata 3-5 giorni dopo la iniezione non si riscontra nel siero il potere agglutinante.

Secondo Besredka (119) la immunità naturale delle cavie per il B. del tifo è dovuta alla fagocitosi; ogni volta che s'impedisce la fagocitosi il B. del tifo uccide la cavia, ed i sieri normali riscaldati a 55° agglutinano il bacillo e facilitano l'opera dei fagociti. Anche Cerruti (120) ha potuto osservare che le cavie immunizzate contro il tifo posseggono un alto valore agglutinante.

Infine dalle esperienze di De Blasi e De Bernardinis (121) risulterebbe che nel siero di cavie immunizzate contro il tifo esistono due specie di agglutinine, alcune facilmente attaccabili dal cloroformio ed aventi la massima affinità per i corpi batterici (*proto agglutinine*), e le altre non attaccabili dal cloroformio ed aventi minore affinità per i corpi batterici (*deutero-agglutinine*).

Ma questo potere agglutinante può mancare o può esercitarsi sopra microbi differenti; Schumacher (122) non ha riscontrato la reazione di Widal durante il decorso di un tifo grave seguito da morte, e Puppo ed Ottoni (123) studiando il potere agglutinante del siero di sangue di cavie vaccinate da Sanarelli con un sol tipo di B. tifico, su alcune specie di bacilli tifici, concludono che l'agglutinazione può ottenersi sopra un microbo indifferente con maggiore facilità che sopra il microbo infettante.

Per immunizzare le cavie mi sono servito di iniezioni intraperitoneali di brodoculture uccise alla temperatura di 70° per 24 ore e seguite dall'inoculazione di culture virulente.

Una cavia di 400 gr., inoculata nel peritoneo con 1 cmc. di cultura non trattata, moriva in 18-24 ore.

Ad ogni cavia furono inoculati, in un periodo di 8 giorni, 30 cmc. di brodoculture restirilizzate, e dopo altri 8 giorni s'iniettarono 2 cmc. di culture virulente. Tutte le cavie subirono un notevole dimagramento e qualcuna è morta.

Il salasso fu fatto nel modo sopradescritto, e dopo 5 giorni dall'ultima inoculazione. Nelle cavie splenectomizzate la vaccinazione venne praticata dopo 5 giorni dalla splenectomia.

I quadri seguenti riportano i risultati delle ricerche fatte in diversi periodi.

Per queste prove furono scelte culture in brodo di 24 ore; le diverse miscele furono tenute a 37° per 6 ore e poi alla temperatura ambiente di 25°-26°. L'osservazione macroscopica fu fatta dopo 24 ore e controllata dall'esame microscopico in goccia pendente.

Per gli opportuni confronti ho voluto stabilire prima il potere agglutinante del siero di sangue di cavie normali per facilitare in se-

guito l'esatto controllo del potere delle cavie vaccinate, e mi risulta che normalmente le cavie posseggono un basso potere agglutinante che varia da 1 : 10 a 1 : 15, e che questa proporzione è superata rare volte e di poco.

Salasso dopo 5 giorni dalla immunizzazione completa.

Rapporto	1:20	1:50	1:70	1:100	1:150	1:200	1:250	1:300	1:500	1:1000
Siero di cavia normale . .	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Siero di cavia splenectomizzata.	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—

Avendo presentato il siero di sangue di cavia splenectomizzata un potere agglutinante molto debole in confronto al siero di sangue di cavia sana, ho ripetuto il salasso dopo 15 giorni dall'avvenuta immunizzazione in tutte le cavie, e saggiato il loro siero nelle stesse proporzioni di prima.

Salasso dopo 15 giorni dalla immunizzazione.

Rapporto	1:20	1:50	1:70	1:100	1:150	1:200	1:250	1:300	1:500	1:1000
Siero di cavia normale . .	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Siero di cavia splenectomizzata.	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—

Come si vede, il siero di sangue delle cavie splenectomizzate non presenta alcun aumento del potere agglutinante, anzi si osserva una sensibile diminuzione.

Furono quindi iniettati nel peritoneo delle cavie smilzate (nella speranza di vederne aumentato il loro potere agglutinante) 10 cmc. di cultura sterile in due volte, e con l'intervallo di 3 giorni, quantità sufficiente per conferire alle cavie un notevole potere agglutinante. La stessa quantità di cultura fu pure iniettata alle cavie normali.

Salasso dopo 20 giorni dalla immunizzazione
e dopo 5 giorni dall'ultima inoculazione di 10 cm³ di cultura.

Rapporto	1:20	1,50	1:70	1:100	1:150	1:200	1:250	1:300	1:500	1:1000
Siero di cavia normale . .	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Siero di cavia splenectomizzata.	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—

Da queste esperienze risulta che:

1° le cavie smilzate anche dopo molto tempo dalla splenectomia non producono che un siero leggermente agglutinante;

2° in esse il potere agglutinante non aumenta neanche dopo la inoculazione di altra cultura;

3° *la funzione della milza, nella produzione delle agglutinine, è veramente necessaria*, e giova non solo ad aumentare, ma a rendere stabile nell'organismo questo potere;

4° questi risultati verrebbero a confermare le osservazioni di Mills (124) ed indicherebbero che *in vitro* la polpa splenica farebbe aumentare la virulenza del B. del tifo, mentre nell'organismo, esaltando la tossicità delle culture inoculate, favorirebbe una forte e duratura immunizzazione dell'animale, come risulta dalle mie esperienze.

Approfittando di queste cavie vaccinate ho cercato un altro potere del siero di sangue, il *potere batteriolitico*, per vedere se negli animali smilzati ed immunizzati era possibile sorprendere la fagocitosi, in considerazione anche delle osservazioni di Deutsch (125) e Besredka (126), che attribuiscono agli organi linfoidi ed alla fagocitosi la proprietà di conferire al siero di sangue di animali vaccinati con culture di tifo attenuate, il potere agglutinante.

Nelle diverse miscele fatte per la prova di Widal si era osservato, facendo preparati colorati con violetto di genziana, che il corpo batterico, specie nelle diluizioni basse, era trasformato in granuli, presentandosi i bacilli raggrinzati, più piccoli, tozzi, ovali e trasparenti; e questo fatto fu osservato adoperando siero di sangue di cavia smilzata e di cavia normale.

Seguendo la tecnica di Pfeiffer (127-128), si inoculò nella cavità peritoneale di ogni cavia ½ cmc. di cultura non trattata, e dopo mezz'ora si sacrificarono due cavie, di cui una smilzata ed una normale; le altre furono uccise ogni mezz'ora.

Nelle prime osservazioni le cavie normali avevano esercitato il loro potere batteriolitico sul corpo batterico, mentre nelle cavie splenectomizzate è trascorsa un'ora, prima di osservarsi nettamente il fenomeno; due ore dopo, in tutti gli animali la batteriolisi era completa.

Il corpo batterico, all'esame microscopico si presentava di poco rimpicciolito, ma plasmolizzato e sempre riunito a gruppi, e, pur essendo ridotto in queste condizioni il maggior numero dei batteri, fu possibile ottenere culture in brodo facendo innesti di liquido peritoneale anche di cavie uccise dopo 2 ore dall'inoculazione; ciò conferma le precedenti osservazioni di Bitter (129), Stern (130) e Sana-

relli (131), che « i bacilli di Eberth conservano nell'organismo degli animali vaccinati contro il tifo, per lungo tempo la propria vitalità ».

Oltre a quanto ho ricordato sopra sulle proprietà specifiche del siero di cavie immunizzate contro il tifo, risulterebbe da queste esperienze un fatto importante da cui è facile dedurre che il potere agglutinante di un siero non è in intimo rapporto col potere batteriolitico di esso: infatti, per l'azione agglutinante del siero, esiste una sensibile differenza fra quello proveniente da cavia sana e cavia splenectomizzata, mentre l'azione batteriolitica è solo di poco ritardata nelle cavie smilzate, fatto che fa pensare alla diversa origine delle agglutinine e delle batteriolisine.

Infezione tetanica.

Le ricerche furono indirizzate a sapere se anche per questa malattia esistono delle differenze di resistenza fra gli animali splenectomizzati e quelli normali.

Della ricca letteratura ricordo solamente che Behring (132-133), Nocard (134), Tizzoni e Cattani (135-136-137) ottennero dagli animali un siero altamente immunizzante e curativo.

Bech (138) praticò molte esperienze sugli animali e studiò un caso di tetano nell'uomo preso in cura molto per tempo, per decidere se è possibile la guarigione del tetano a mezzo del siero, e venne alla conclusione che fin'ora, pur disponendo di un siero antitossico di valore elevatissimo, non si è in grado di guarire l'infezione, anche curata nei primordi.

Ad analoghe conclusioni venne Vaillard (139) per i casi di tetano nell'uomo e negli animali, specie quando le tossine hanno spiegato la loro azione sull'organismo; l'A. però afferma, che nelle forme croniche e come preventivo, il siero antitetanico ha un'azione efficace, e questi risultati si hanno perchè l'azione del siero nell'organismo non è di lunga durata ed è più facile guarire quando l'infezione avviene nel tessuto sottocutaneo dove la fagocitosi è più spiccata, che quando l'infezione si fa intramuscolare.

Dönitz (140) istituì delle ricerche per stabilire se il siero antitetanico si deve considerare come un vero rimedio contro il tetano, se cioè l'antitossina che contiene ha il potere di neutralizzare la tossina tetanica anche quando questa è già collegata con i tessuti dell'organismo, e credo che il siero antitetanico devesi considerare un vero mezzo curativo.

Le ricerche più importanti negli animali furono condotte da Kitasato (141); egli, inoculando spore tetanigene, ha potuto ottenere nei topi uno stadio d'incubazione che durava circa 24 ore, e la morte seguiva dopo 60; in questi casi con l'iniezione intraperitoneale di 1 cmc. di siero, fatta quando l'infezione era avvenuta già da 15 ore, si salva l'animale. In altra serie di esperienze (142) fu iniettato ai topi, per 3 giorni conse-

cutivi, 1 cmc. di siero al giorno. La prima iniezione fu fatta in alcuni 48 ore dopo l'infezione, in altri dopo 24 ore, ed in altri 12 ore dopo; dei primi 10 topi ne morirono 5, ma dopo 80 ore, mentre gli animali di controllo erano morti dopo 55 ore; gli altri si salvarono tutti.

Facendo la prima iniezione di siero 24 ore dopo l'infezione e ripetendola per altri due giorni consecutivi occorrono, secondo l'A., per la guarigione dei topi almeno 4/10 di cmc. al giorno, e per quella delle cavie almeno 4 cmc.; mentre quando l'iniezione fu fatta contemporaneamente all'infezione si salvarono tutte le cavie che avevano ricevuto almeno da 0.25 a 2 cmc. di siero. Con l'iniezione preventiva, fatta 15 ore prima della inoculazione delle spore, bastano 0.001 di cmc. nei topi, e 0.1 di cmc. nelle cavie per prevenire lo sviluppo del tetano.

Sulla guida delle ricerche di Kitasato ho istituito le seguenti esperienze servendomi della cavia, animale sensibilissimo all'infezione in parola.

Il materiale d'innesto veniva preparato in culture in brodo ricche di spore e tenute per 2 ore alla temperatura di 80°; nella cultura si immergevano dei fili di ferro di eguale misura, sterilizzati precedentemente a bagno-maria.

Esposte le culture per 24 ore alla temperatura ambiente con una pinza sterile si prendono i fili di ferro dal fondo della provetta e si asciugano in capsule di Petri per 4-5 ore nella stufa ad 80°. Ad ogni animale, praticata una saccoccia sotto la pelle del dorso s'inocula un filo e la parte si copre con strato di cotone imbevuto di collodion doppio, così si ottenne sempre nelle cavie di confronto la morte per tetano in un tempo che variò da 3 a 4 giorni, mentre inoculando tossina e spore il periodo d'incubazione era di molto ridotto.

In queste ricerche fu usato il siero dell'Istituto sieroterapico di Berna.

L'iniezione fu fatta nelle vene e solo qualche volta sotto cute, precisamente all'addome, ma sempre molto distante dal sito di inoculazione delle spore.

I Esperienza.

Potere immunizzante. — Si inoculano nelle vene di 12 cavie, di cui 6 smilzate e 6 sane, da 2 a 4 cmc. di siero antitetanico per ciascun animale, e dopo 12-48 ore si pratica l'inoculazione delle spore tetanigene, come nel seguente quadro.

L'inoculazione del siero fu praticata alle cavie smilzate 5 giorni dopo la splenectomia.

Quantità di siero immunizzante	Animale	Inoculazione delle spore tetanigene	Esito
2 cm^3.	Cavia smilzata	Dopo 12 ore	Sopravvive
2 »	Id.	» 24 »	Id.
2 »	Id.	» 48 »	Id.
4 »	Id.	» 12 »	Id.
4 »	Id.	» 24 »	Morte
4 »	Id.	» 48 »	Sopravvive
2 »	Cavia normale	» 12 »	Id.
2 »	Id.	» 24 »	Id.
2 »	Id.	» 48 »	Morte
4 »	Id.	» 12 »	Sopravvive
4 »	Id.	» 24 »	Id.
4 »	Id.	» 48 »	Id.

Come si vede la maggior parte degli animali non presentarono sintomi tetanici, e solamente si ebbe la morte accidentale in due cavie, di cui una smilzata ed inoculata con 4 cmc. di siero immunizzante ed una sana, che aveva ricevuto nelle vene preventivamente 2 cmc. di siero. Questi due casi di morte in confronto al risultato delle altre cavie non possono disturbare le deduzioni di ordine generale che in seguito esporrò, ricordo solamente ora che le due cavie morte non presentarono alcun sintomo tetanico, e resta quindi assodato fin da ora, non solo l'efficacia dell'inoculazione preventiva del siero antitetanico, ma anche che nessuna differenza in queste prove esiste fra animali splenectomizzati e normali.

II Esperienza.

Potere curativo. — Anche in queste ricerche furono utilizzate le cavie smilzate dopo 5 giorni dalla splenectomia. In alcune cavie l'inoculazione endovenosa di siero fu fatta contemporaneamente all'iniezione delle spore, in altre si fecero trascorrere 24 ore.

Quantità di siero curativo	Animale	Tempo trascorso dalla inoculazione delle spore	Esito
2 cm^3.	Cavia smilzata	Contemporaneamente	Morte
2 »	Id.	Dopo 24 ore	Id.
4 »	Id.	Contemporaneamente	Sopravvive
4 »	Id.	Dopo 24 ore	Morte
2 »	Cavia normale	Contemporaneamente	Id.
2 »	Id.	Dopo 24 ore	Sopravvive
4 »	Id.	Contemporaneamente	Morte
4 »	Id.	Dopo 24 ore	Id.

Da queste esperienze si vede che l'azione del siero a scopo curativo non dà i risultati come nella inoculazione preventiva, e non possiamo spiegare la morte anche degli animali inoculati contemporaneamente col siero e con le spore; ciò potrebbe forse dipendere da che in queste prove non è possibile titolare la dose minima mortale e conoscere esattamente il numero delle spore contenute in ogni singolo pezzo di ferro, per stabilire la quantità di siero necessaria.

Infezione difterica.

I risultati poco certi delle esperienze sul tetano mi hanno invogliato ad istituire delle ricerche sulla difterite, in considerazione anche che in queste prove era possibile stabilire esattamente la dose minima mortale ed il numero delle U. I. del siero impiegato; mentre che per il tetano non era possibile altrettanto non potendosi conoscere il numero vero delle spore inoculate e non disponendo di grandi quantità di siero e ripetere su larga scala le esperienze. Tutto ciò a prescindere dal fatto che il siero antidifterico ha dato anche nella pratica medica i migliori risultati inoculato a scopo curativo e preventivo, fatto non

ancora bene assodato per il siero antitetanico, sia per lo scarso numero delle osservazioni sull'uomo in confronto alla difterite, sia perchè non possiamo ottenere dagli animali un siero antitetanico di valore elevatissimo.

A tutti è noto il febbrile lavoro dopo le pubblicazioni di Behring (143-144), Roux e Martin (145) sulla preparazione del siero antidifterico e sui risultati ottenuti favorevolmente anche in gravi casi di difterite.

Fin dal principio della pratica antidifterica si è riconosciuto che il siero possedeva oltre un potere curativo anche un'azione preventiva e furono inoculati a questo scopo numerosi bambini con quantità varie di siero, ma Samuel (146), Allan (147), Mensi (148), Monti (149), Walter (150), Venturi e Medici (151), Conti (152), Bordoni Uffreduzzi (153) hanno osservato che in un tempo non lontano si può perdere l'immunità acquisita.

Questi osservatori si limitarono ad iniettare non più di 300 U. I., dose tale da non conferire una immunità durevole: ricordo al proposito che il prof. Terni (154) fin dai primordi ha suggerito in questi casi la inoculazione di 500 U. I., e come rilevasi dalla relazione di Bandi (155) e dalle nostre note di epidemiologia (156) non si è visto insorgere la infezione prima del 5°-6° mese.

Ho voluto ricordare ciò per dar ragione perchè anche a scopo preventivo ho inoculato nelle esperienze che riporterò, dosi di siero molto superiori al bisogno.

Esperienze in animali furono indirizzate a stabilire in quali organi si accumula la tossina difterica e quale è l'azione e la sede dell'antitossina; queste ricerche furono praticate in esteso da Zagari e Calabrese, alle cui interessanti pubblicazioni rimando il lettore (157-158); ricordo solamente che dalle esperienze di questi AA. risulterebbe che il fegato, l'edema e le capsule surrenali sono i tessuti dove più si trova accumulato il veleno difterico, mentre che il rene e la milza non se ne mostrano ugualmente forniti, e che da esperimenti fatti con organi di animali immunizzati risulterebbe che è nel sangue dove la sostanza antitossica esercita il suo potere neutralizzante.

Marenghi (159) ha osservato che la iniezione di miscele perfettamente neutre di tossina ed antitossina difterica. mentre nelle cavie normali non produce nessun effetto, nelle cavie biscapsulate invece provoca le stesse reazioni (reazione locale, morte, tumore di milza) che la iniezione di semplice tossina.

Cappellani (160) per alcune ricerche fatte sulla tossina difterica attribuisce solo ai leucociti il potere di resistenza dell'organismo a questa tossina, mentre Manfredi e Viola (161) estendono questa facoltà al sistema ganglionare linfatico.

La cultura da me utilizzata era preparata da un mese in grosso pallone di 5 litri contenente 2 litri di brodo; ed un decimo di cmc. di essa uccideva in circa 36 ore una cavia di 500 gr.

Il siero è quello preparato dall'Istituto sieroterapico di Milano, il

cui controllo, dosato col metodo Ehrlich, stabilisce 1000 U. I. in 10 cmc. di siero.

Non ho ricercato quanto afferma Roux (162) sulla disparità del rapporto fra il numero di U. I. di un siero stabilito col metodo Ehrlich e il suo valore immunizzante e curativo, perchè Marx (163), eliminando per quanto era possibile le differenze nel riassorbimento, iniettò il siero e la tossina nelle vene del coniglio e della cavia e da numerose ricerche fatte, con siero di valore diverso, venne alla conclusione che il numero di U. I. di un siero (dosato col metodo Ehrlich), il suo valore immunizzante e curativo stanno fra loro in un rapporto costante e precisamente il potere immunizzante ed il curativo sono direttamente proporzionali al contenuto in U. I. D'altronde questo argomento è stato oggetto di accurato lavoro di Maggiora (164), il quale confrontando tutti i diversi metodi di dosaggio finora descritti, venne alla conclusione che il siero antidifterico dosato col metodo primitivo di Ehrlich contiene un numero di U. I. superiore a quello che risulta col dosaggio mediante il nuovo metodo di Ehrlich.

L'inoculazione della tossina nelle nostre esperienze fu fatta sotto cute, mentre che il siero venne sempre inoculato nelle vene per avere un'azione più pronta e più sicura come risulta dalle ricerche di Perini (165), Gagnoni (166), Cairus (167) e da risultati proprî in bambini in cui ho iniettato con successo in casi disperati il siero antidifterico direttamente nelle vene (156).

I Esperienza.

Potere immunizzante. — Ad un numero di 6 cavie spleneotomizzate da 5 giorni e ad altrettante cavie normali s'inoculano nelle vene 3 cmc. di siero ciascuna.

Dopo 12-48 ore s'inocula sotto cute 1 cmc. di cultura.

Quantità di siero immunizzante	Animale	Inoculazione della tossina	Esito
3 cm³	Cavia smilzata	Dopo 12 ore	Sopravvive
3 »	» »	» » »	»
3 »	» »	» 24 »	»
3 »	» »	» » »	»
3 »	» »	» 48 »	»
3 »	» »	» » »	»
3 »	Cavia normale	» 12 »	»
3 »	» »	» » »	»
3 »	» »	» 24 »	»
3 »	» »	» » »	»
3 »	» »	» 48 »	»
3 »	» »	» » »	»

II Esperienza.

Potere curativo. — Lo stesso numero di animali e con le modalità precedenti viene inoculato sotto cute con 1 cmc. di cultura. In alcune cavie contemporaneamente, in altre dopo 12-24 ore dalla inoculazione di tossina s'inoculano nelle vene 5 cmc. di siero, come nel seguente quadro.

Quantità di siero curativo	Animale	Inoculazione della tossina	Esito
5 cm³	Cavia smilzata	Contemporaneamente	Sopravvive
5 »	» »	»	»
5 »	» »	Dopo 12 ore	»
5 »	» »	» » »	»
5 »	» »	» 24 »	»
5 »	» »	» » »	»
5 »	Cavia normale	Contemporaneamente	»
5 »	» »	»	»
5 »	» »	Dopo 12 ore	»
5 »	» »	» » »	»
5 »	» »	» 24 »	»
5 »	» »	» » »	»

Da questi risultati si vede chiaramente che l'organismo reagisce a seconda della infezione di cui è invaso, e *mentre nel carbonchio malattia eminentemente setticoemica è indispensabile la milza come organo principale di difesa, nel tetano e nella difterite in cui agiscono le tossine quest'organo non è di pari importanza.*

SPIEGAZIONE DELLE FIGURE DELLE TAVOLE XI.

Colorazione col metodo di Gram.

Oc. compens. 8, obb. apocr. 3 mm. Koristka, apert. 1.30, lunghezza del tubo mm. 160.

Fig. 1ª — Cute di coniglio splenectomizzato ed immunizzato.
La cute fu tolta 48 ore dopo la inoculazione della cultura.

Fig. 2ª — Cute di coniglio normale immunizzato.
La cute fu tolta 48 ore dopo la inoculazione della cultura.

Fig. 3ª — Milza tolta da un coniglio 48 ore dopo la inoculazione del siero e 72 ore dalla inoculazione della cultura.

BIBLIOGRAFIA.

1. Neumann. *Neue Beiträge zur Kentniss der Blutbildung*. Arch. der Heilkunde, 1879.
2. Picard e Malassez. *Des altérations des globules sanguins consécutives à l'extirpation de la rate*. Soc. biol., 1878.
3. Bizzozzero e Salvioli. *Ricerche sperimentali sulla ematopoiesi splenica*. Arch. per le scienze mediche, 1881.
4. Tizzoni e Fileti. *Studi patologici e chimici sulla funzione ematopoietica*. Atti della R. Accademia dei Lincei, Vol X, ser. 3ª.
5. Tizzoni. *Sulla riproduzione totale della milza*. Arch. per le scienze mediche, 1882.
6. Id. *Sulla riproduzione della milza*. Arch. per le scienze mediche, 1883.
7. Id. *Sulla splenectomia del coniglio, ecc.* Arch. per le scienze mediche, 1883.
8. Winogradow. *Ueber die Veränderungen des Blutes, der Lymphdrüsen und des Knochenmarks nach der Milzextirpation*. Centralbl. f. medic. Wissenschaft, 1882.
9. Grigorescu. *Modification du sang par le séjour prolongé expér. dans la rate*. Compt. rendu de la Soc. de biologie, 1887.
10. Id. *Quelques expériences nouvelles sur le rôle hématopoiétique de la rate*. Arch. de physiologie normale et pathologique, 1891.
11. Vulpius. *Beiträge zur Chirurgie und Physiologie der Milz*. Beiträge zur Klinischen Chirurgie. Tübingen, 1894.
12. Bottazzi. *Ricerche ematologiche*. Lo Sperimentale, Sezione biologica, anno 48°.
13. Gabbi. *Ueber Hämolysis in der Milz*. Ziegler's Beiträge, 1893.
14. Id. *Le modificazioni nel sangue dopo la splenectomia in rapporto alla funzione emolitica della milza*. Firenze, Civelli, 1895.
15. Luciani. *Fisiologia dell'uomo*. Milano, Soc. Ed. Libr., 1901.
16. Kourloff. *Ueber die Bedeutung der Milz im Kamfe mit den ins Blut eingedrungenen Microorganismen*. Archiv f. Hygiene, 1889.
17. Bardach. *Recherches sur le rôle de la rate dans les maladies infectieuses*. Annales de l'Inst. Pasteur, 1889.

Fig. 1ª

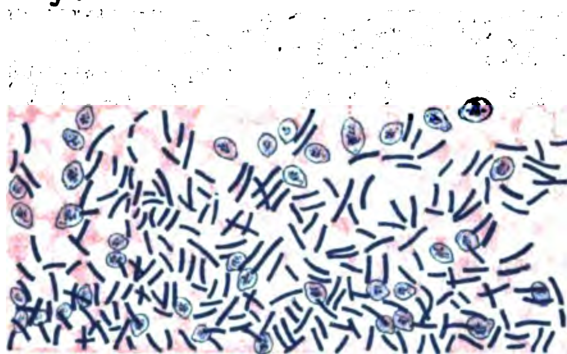


Fig. 2ª

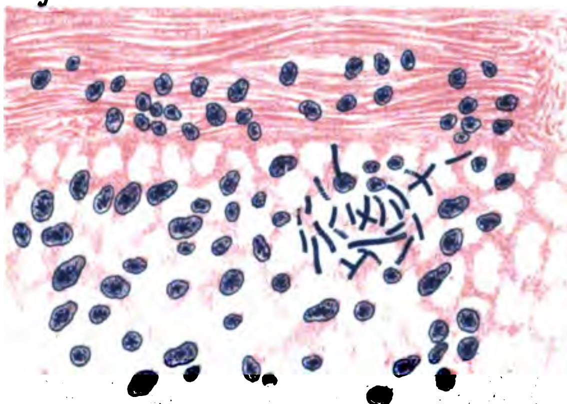
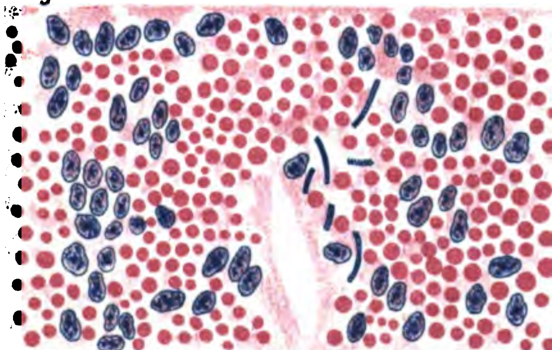


Fig. 3ª



Prem. Stab. Lit. La Sicilia. Messina.

18. BARDACH. *Recherches sur la fonction de la rate dans les maladies infectieuses.* Annales de l'Inst. Pasteur, 1891.
19. WERIGO. *Développement du charbon chez le lapin.* Annales de l'Inst. Pasteur, 1894.
20. SOUDAKEWITCH. *Recherches sur la fièvre récurrente.* Annales de l'Institut Pasteur, 1891.
21. COURMONT e DUFFAU. *Marches des infections expérimentales chez le lapin splénectomisé.* Compt.-rend. de la Soc. de biolog., n. 21.
22. BLUMREICH e JACOBY. *Ueber die Bedentung der Milz bei Künstlichen und natürlichen Infectionen.* Zeitschr. f. Hygiene, 1898.
23. TIZZONI e CATTANI. *Ueber die Wichtigkeit der Milz beider experimentellen Immunisirung des Kaninchens gegen den Tetanus.* Centralbl. f. Bakteriolog., 1892.
24. MONTUORI. *Influenza dell'estirpazione della milza sul potere microbicida del sangue.* Riforma medica, 1892.
25. JATTA. *Experimentelle Untersuchungen über die Agglutination des Typhusbacillus und der Mikroorganismen der Coligruppe.* Zeitschr. f. Hygiene, 1900.
26. CAPOGROSSI. *Isoagglutinine ed isolisine del siero umano* (La milza ed alcuni poteri specifici del siero). Questi Annali, 1903.
27. RATH. *Ueber den Einfluss der blutbildenden Organe auf die Entstehung der Agglutinine.* Centralblat f. Bakteriolog., 1899.
28. MILLS. *Étude de l'action de la pulpe splénique sur le bacille de la fièvre typhoïde.* Semaine médicale, 1898.
29. CASAGRANDI. *Studi sul carbonchio ematico* (Memoria III). Questi Annali, 1900.
30. ID. *Studi sul carbonchio ematico* (Memoria IV). Questi Annali, 1902.
31. BOCHICCHIO. *Sul modo di conferire al siero di sangue di cavia potere agglutinante e battericida sul bacillo del carbonchio.* Questi Annali, 1902.
32. SCLAVO. *Ueber die endovenösen Injektion des Milzbrandbacillus in gegen Milzbrand stark immunisierte und über das Verhatten der spezifische Schutz verleihenden Substanzen bei diesen.* Centralbl. f. Bakteriolog., 1899.
33. SOBERNHEIM. *Ueber ein neues Versahren der Schutzimpfung gegen Milzbrand.* Berliner klinische Wochensch., 1902.
34. SERAFINI ed ERRIQUEZ. *Sull'azione del sangue di animali immuni inoculato ad animali suscettibili per carbonchio.* Questi Annali, 1891.
35. ENDERLEN. *Versuche über die bakterienfeindliche Wirkung.* Münchener medicinische Wochenschr., 1891.
36. PETERMANN. *Sur la substance baktéricide du sang décrite par le professeur Ogata.* Annales de l'Inst. Pasteur, 1891.
37. ROUDENKO. *Influence du sang de grenouille sur la résistance des souris contre le charbon.* Annales de l'Inst. Pasteur, 1891.
38. OGATA e JASUHARA. *Ueber die Immunitätsfrage.* Deutsche Medicin. Wochensch., 1891.
39. BEHRING. *Ueber Desinfection, Desinfectionsmittel und Desinfectionsmethoden.* Zeitschr. f. Hygiene, 1890.
40. RONDEAU. *La transfusion du sang comme procédé général d'immunité vaccinale.* Compt. rend. de la Soc. de biolog., T. II, S. 9.

41. Hankin. *Cures of infections diseases.* British med. journal, 1891. Centralblat f. Bakteriolog., 1891.

42. Metschnikoff e Roux. *Sur la propriété bactéricide du sang de rat.* Annales de l'Inst. Pasteur, 1891.

43. Cacace. *Refrattarietà della volpe all'azione del bacillo del carbonchio.* Monitore zoologico italiano, anno 12°, n. 8.

44. Giusti. *Sulla immunità naturale della volpe verso il carbonchio, ecc.* Rivista d'igiene e sanità pubblica, 1905.

45. Sclavo. *Sulla preparazione del siero anticarbonchioso.* Rivista d'igiene e sanità pubblica, 1896.

46. Id. *Sulla preparazione del siero anticarbonchioso* (II Memoria). Rivista d'igiene e sanità pubblica, 1896.

47. Id. *Nuove ricerche sperimentali sul potere curativo del siero anticarbonchioso.* Rivista d'igiene e sanità pubblica, 1901.

48. Sobernheim. Loc. cit., n. 33.

49. Id. *Weitere Untersuchungen über Milzbrandimmunitat.* Zeitschr. f. Hygiene, 1899.

50. Ottolenghi. *Sul carbonchio sperimentale nelle cavie e sul potere protettivo del siero Sclavo contro tale infezione.* Atti della R. Accadem. dei Fisiocritici, ser. IV, vol. XIV.

51. Casagrandi. *Studio sul carbonchio ematico* (I Memoria). Questi Annali, 1899.

52. Id. *Studi sul carbonchio ematico* (IV Memoria). Ibidem, 1900.

53. Id. *Studi sul carbonchio ematico* (V Memoria). Ibidem, 1902.

54. Sclavo. Loc. cit., n. 45.

55. Id. Loc. cit., n. 47.

56. Id. *Sullo stato presente della sieroterapia anticarbonchiosa.* Rivista d'igiene e sanità pubblica, 1903.

57. Casagrandi. Loc. cit., n. 52.

58. Bochicchio. Loc. cit., n. 31.

59. Landois. *Trattato di fisiologia dell'uomo.* Milano, Frances. Vallardi, 1899.

60. Luciani. Loc. cit., n. 15.

61. Gabbi. Loc. cit., n. 14.

62. Sclavo (II Memoria). Loc. cit., n. 46.

63. Marcheux. *Sérum anticharbonneux.* Annales de l'Inst. Pasteur, 1895.

64. De Nittis. *Sur l'immunité des pigeons et des cobayes vaccinés contre le charbon et sur les propriétés de leur sérum.* Annales de l'Inst. Pasteur, 1901.

65. Sclavo. Loc. cit., n. 56.

66. Casagrandi (VI Memoria). Loc. cit., n. 30.

67. Phisalix. *Étude expérimentale du rôle attribué aux cellules lymphatiques, dans la protection de l'organisme contre l'invasion du bacillus anthracis, et dans le mécanisme de l'immunité acquise.* Compt. rend. de l'Ac. des scien., T. CXI. — Semaine médicale, 1890.

68. Perez. *Del modo di comportarsi del sistema ganglionare linfatico rispetto ai microrganismi.* Questi Annali, 1897.

69. Manfredi e Viola. *Influenza dei gangli linfatici nella produzione dell'immunità verso le malattie infettive.* Questi Annali, 1898.

70. Simoncini. *Contributo allo studio della reazione delle ghiandole linfatiche nelle infezioni acute e croniche.* Questi Annali, 1903.

71. Bardach. Loc. cit., n. 17 e 18.
72. Aujeszky. *Zur Frage der Milzbrandimmunisation.* Contralbl. f. Bakteriolog., 1898.
73. Metschnikoff. *L'état actuel de la question de l'immunité.* Rapport au Congrès internat. de Budapest. Annales de l'Inst. Pasteur, 1894.
74. Pfeiffer e Marx. *Untersuchungen über die Bildungsstätte du Cholera-schutzstoffe.* Deutsche medicinische Wochensch., 1898.
75. Id. *Ueber Bildungsstätte der Coleraschutzstoffe.* Zeitsch. f. Hygiene, 1898.
76. Deutsch. *Contribution à l'étude de l'origine des anticorps typhiques.* Annales de l'Inst. Pasteur, 1899.
77. Gengou. *Étude sur les rapports entre les agglutinines et les lysines dans le charbon.* Annales de l'Inst. Pasteur, 1899.
78. Casagrandi (III Memoria). Loc. cit., n. 29.
79. Lambette e Maréchal. *L'agglutination du bacille charbonneaux par le sang humain normal.* Annales de l'Inst. Pasteur, 1899.
80. Casagrandi (VI Memoria). Loc. cit., n. 30.
81. Bochicchio. Loc. cit., n. 31.
82. Bitter. *Ueber Festigung von Versuchsthieren gegen die Toxine du Typhus-bacillen.* Zeitschr. f. Hygiene, Bd. XII.
83. Sanarelli. *Études sur la fièvre typhoïde expérimentale* (I Mémoire). Annales de l'Inst. Pasteur, 1892.
84. Id. *Studi sulla febbre tifoide sperimentale* (II e III Memoria). Rivista d'igiene e sanità pubblica, 1894.
85. Peiper e Beumer. *Ueber die immunisierende und heilende Wirkung antitoxischen Hammelserums gegen das Typhusgift.* Zeitsch. f. Klinische Medizin. Bd. XXVIII.
86. Pfeiffer. *Ueber die specifische Immunitäts. Reaction der Typhusbacillen.* Deutsche med. Wochensch., 1894.
87. Pfeiffer. e Kolle. *Experimentelle Untersuchungen zur Frage der Schutzimpfung des Menschen gegen Typhus abdominalis.* Deutsche med. Wochenschr., 1896.
88. Widal. *Sérodiagnostic de la fièvre typhoïde.* Sociétè médicale des Hôpitaux, 26 juin 1896, et Congrès de Nancy, 6 août 1896.
89. Id. *Sur les propriétés agglutinantes et bactéricides du sérum des convalescentes de fièvre typhoïde.* Semaine médicale, 1896.
90. Widal e Sicard. *La réaction agglutinante chez les typhiques comparée pendant l'infection et pendant l'immunité.* Presse méd., 1896.
91. Id. *Réaction agglutinante du sang et du sérum desséchés des typhiques et de la sérosité des vésicatoires.* Presse méd., 1896.
92. Bebi. *Sierodiagnostica del tifo.* Gazzetta degli ospedali, 1896.
93. Comba. *La sierodiagnostica della febbre tifoide.* Riforma medica, 1896.
94. Courmont. *Tecnique et valeur du séro-diagnostic de la fièvre typhoïde.* Province méd., 1896.
95. Pugliesi. *Sulla sierodiagnostica del tifo.* Riforma medica, 1896.
96. Maragliano. *La sierodiagnosi di Widal.* Gazzetta degli ospedali, 1896-1897.
97. Bandi. *Considerazioni sopra un'epidemia di tifo, ecc.* L'Ufficiale sanitario, Rivista d'igiene e medicina pratica, 1897.

98. Brancati (Clinica di Tomaselli). *La sierodiagnosi della febbre tifoide.* Gazzetta degli ospedali e delle cliniche, 1899.

99. Bertarelli. *Per la tecnica della siero-diagnosi.* Comun. alla R. Accad. di medicina di Torino, 1901.

100. Migliorato. *Contributo alla prova di Widal nella febbre tifoide.* Gazzetta degli ospedali e delle cliniche, 1902.

101. Biffi e Galli. *Per la batteriologia del* tifus levis. Rivista crit. di clin. medica, 1901.

102. Silvestrini e Castellani. *Il reperto del bacillo tifico in clinica.* Settimana medica, 1896.

103. Mills e Thoelen. *Quelques nouvelles applications de la méthode de sérodiagnostic del Widal.* Clinique, 1906.

104. Stern. *Diagnostische Blutuntersuchung beim Abdominat-Typhus.* Centralbl. f. Munchener Medicin., 1896.

105. Id. *Ueber Fehlerquellen der Serodiagnostik.* Berliner klin. Wochensch., 1897.

106. Du Mesnil de Rochemont. *Ueber die Gruber-Widal'sche Serum-Diagnostik bei Typhus abdominalis.* Münchener medicinische Wochenschr., 1897.

107. Haedke. *Die Diagnose des Abdominaltyphus und Widal's serumdiagnostisches Verfahren.* Deutsche medicin. Wochensch., 1897.

108. Siegert. *Ueber die Bedeutung der Wild'schen Serumdiagnose für die Lehre vom Typhus abdominalis des Kindelsalters.* Münchener medicinische Wochenschr., 1897.

109. Van Oordt. *Zur Serodiagnostik des Abdominaltyphus.* Münchener medicinische Wochenschr., 1897.

110. Casagrandi. Società Lancisiana degli ospedali, Roma, 1900.

111. Valagussa. *Ricerche di tecnica sierodiagnostica nella febbre tifoide.* Questi Annali, 1900.

112. Fiocca. *Il valore diagnostico e clinico della reazione di Widal.* Policlinico, 1897.

113. Brancati (Clin. di Tomaselli). Loc. cit., n. 98.

114. Scheffer. *Ueber die Widal'sche Serodiagnose des Typhus abdominalis.* Berliner klinische Wochenschr., 1897.

115. Id. *Ueber die Bedeutung der Widal'schen Serum diagnostik beim Abdominaltyphus.* Vederl. Tijdschr. v. Genusk., 1897.

116. Gabbi. *Febbre tifoide e pseudo-tifoidi.* Relaz. al 1° Congresso regionale di Medic. e Chirurg. in Palermo. Tip. del Progresso. Messina, 1902.

117. Valagussa. Loc. cit., n. 111.

118. Deutsch. *Contribution a l'étude de l'origine des anticorps typhiques.* Annales de l'Inst. Pasteur, 1899.

119. Besredka. *Etude de l'immunité dans l'infection typhique expérimentale.* Annales de l'Inst. Pasteur, 1901.

120. Cerrito. *Intorno alla tecnica della sierodiagnosi del tifo.* Questi Annali, 1904.

121. De Blasi e De Bernardis. *Ricerche sulle agglutinine del tifo.* Questi Annali, 1903.

122. Schumacher. *Bemerkungen zu einem Fall von Typhus abdominalis mit fehlender Widal'scher Reaction.* Zeitschr. f. Hygiene, 1899.

123. Puppo ed Ottoni. *Sulla agglutinazione come mezzo diagnostico del bacillo tifico.* Questi Annali, 1898.

124. MILLS. Loc. cit., n. 25.
125. DEUTSCH. Loc. cit., n. 118.
126. BESREDKA. Loc. cit., n. 119.
127. PFEIFFER. *Die Differentialdiagnose der Vibrionen der Cholera asiatica mit Hülfe der Immunisirung*. Zeitschr. f. Hygiene, 1894.
128. ID. *Weitere Mittheilungen über die specifischen Antikörper der Cholera*. Zeitsch. f. Hygiene, 1895.
129. BITTER. *Ueber Festigung von Versuchstieren gegen die toxine du Typhus-bacillen*. Zeitsch. f. Hygiene, 1892.
130. STERN. *Ueber einige Beziehungen Zwischen menschlichen Blutserum und pathogenen Bakterien*. Sep. Abdruck aus den Verhandlungen des XII Congresses für innere Medizin, 1893.
131. SANARELLI (III Memoria). Loc. cit., n. 84.
132. BEHRING e KITASATO. *Ueber das Zustande kommen der Diphterieimmunität und der Tetanusimmunität bei Thieren*. Deutsche medicin. Vochensch., 1890.
133. BEHRING. *Ueber Immunisierung und Heilung von Versuchsthieren bei Tetanus*. Zeitschr. f. Hygiene, 1892.
134. NOCARD. *Sur la sérothérapie du tétanos*. Recueil de méd. vétér., 1895.
135. TIZZONI e CATTANI. *Sul modo di conferire ad alcuni animali l'immunità contro il tetano*. Riforma Medica, 1891.
136. TIZZONI. *L'immunità contro il tetano studiata negli animali molto recettivi per questa infezione* (cavia, coniglio, topo). Riforma Medica, 1891.
137. ID. *Ulteriori ricerche sperimentali sulla immunità contro il tetano*. Riforma Medica, 1893.
138. BECK. *Experimentelle Untersuchungen über den Tetanus*. Zeitsch. f. Hygiene, Bd. XIX.
139. VAILLARD. *Sur l'emploi du sérum des animaux immunisés contre le tétanus*. Compt. rend. de l'Acad., 1895.
140. DÖNITZ. *Ueber das Antitoxin des Tetanus*. Deutsche medicin. Wochenschr., 1897.
141. KITASATO. *Experimentelle Untersuchungen über das Tetanusgift*. Zeitsch. f. Hygiene, Bd. X.
142. ID. *Heilversuche an Tetanuskranken Thieren*. Zeitschr. f. Hygiene, 1892.
143. BEHRING. *Die Geschichte der Diphytherie. Mit besonderer Berücksichtigung der Immunitätslehre*. Leipzig, Verlay von Georg Thieme, 1893.
144. ID. *Die Blutserumtherapie*. Berlin, 1893.
145. ROUX e MARTIN. *Contribution à l'étude de la diphtérie* (Serum-thérapie). Annales de l'Inst. Pasteur, 1894.
146. SAMUEL. *I risultati della somministrazione dell'antitossina difterica quale mezzo d'immunizzazione*. Archives of Pediatres, 1899, Riassunto Rivista d'Igiene e Sanità pubblica, 1899, pag. 539.
147. ALLAN. *L'azione profilattica del siero antidifterico*. Münchener Med. Wochensch., 1899. Riassunto Rivista d'Igiene e Sanità pubblica, 1899, pag. 715.
148. MENSI. Atti della Società piemontese d'Igiene, 22 giugno 1898. Rivista d'Igiene e Sanità pubblica, 1898, pag. 559.
149. MONTI. *Heilerfolge des Heilserums bei Diphteherie*. Allg. Wiener med. Ztg. n. 38, 39. Archiv f. Kinderheilk. Bd. 24, 1897.

150. Walter. *Zur Statistik der Heilserums.* Vereins b. d. Pfälz. Arz. Bd. XIII, pag. 113.
151. Venturi e Medici. *Di una epidemia difterica e del valore curativo e profilattico del siero Behring.* Il Pratico, 1898.
152. Conti. *La difesa contro la difterite colle iniezioni sieroprofilattiche.* Rivista d'Igiene e Sanità pubblica, 1898.
153. Bordoni Uffredduzzi. *Contributo alla profilassi della difterite mediante le iniezioni di siero immunizzante.* Atti della Società piemontese di Igiene. Rivista d'Igiene e Sanità pubblica, 1898.
154. Terni. *Relazione sanitaria dell'anno 1896.* Tip. Filomena, Messina, 1896.
155. Bandi. *La sieroprofilassi della difterite.* L'Ufficiale Sanitario. Rivista d'Igiene e medicina pratica, 1899.
156. Mazzei. *Note statistiche ed epidemiologiche sul comune di Messina.* Tip. Filomena, Messina, 1907.
157. Zagari e Calabrese. *Ricerche cliniche sperimentali sulla tossina ed antitossina difterica.* Riforma Medica, 1895.
158. Id. *Ulteriori ricerche cliniche e sperimentali sulla tossina ed antitossina difterica.* Giorn. Inter. delle Scienze Mediche, 1895.
159. Marenghi. *Nuove osservazioni sull'azione reciproca della tossina e dell'antitossina difterica.* Estratto dai Rendiconti del R. Ist. Lomb. di sc. e lett., Serie II, Vol. XXXIV, 1901.
160. Cappellani. *Dell'azione protettiva dei leucociti contro i veleni batterici.* Riforma Medica, 1903.
161. Manfredi e Viola. Loc. cit., n. 69.
162. Roux. X Congresso internazionale di Igiene e Demografia in Parigi, 1900. Deutsche Vierteljahrsschrift für öffent. Gesundheitspflege. Bd. XXXII.
163. Marx. *Experimentelle Untersuchungen über die Beziehung zwischen dem Gehalt an Immunitätseinheiten und dem schützenden und heilenden Werth der Diphtherieheilserv.* Zeitschr. f. Hygiene, 1901.
164. Maggiora. *Il valore immunizzante del siero antidifterico in rapporto ai suoi più comuni metodi di dosaggio.* Il Policlinico M., 1903.
165. Perini. *Della immunità contro la difterite*, ecc. Rivista d'Igiene e Sanità pubblica, 1896.
166. Gagnoni. *Di tre gravi casi di difterite guariti con l'iniezione nelle vene di siero antidifterico.* Gazzetta degli Ospedali, 1899.
167. Cairus. *La cura della difterite con il siero antidifterico per iniezioni intravenose.* The Lancet, 1902. Riassunto. Rivista d'Igiene e Sanità pubblica, 1902.

ISTITUTO D'IGIENE DELLA R. UNIVERSITÀ DI PADOVA

Sulla funzione del cloruro di sodio nel fenomeno dell'agglutinazione

per il dott. ARTURO TREVISAN, assistente.

Alla produzione del fenomeno dell'agglutinazione dei batteri due fattori soltanto si considerarono dapprima come indispensabili: il siero di un animale immunizzato per un dato microrganismo, ed il microrganismo stesso. La sostanza agglutinante e quella agglutinabile, pareva bastassero da sole a produrre il fenomeno. Più recentemente si vide però che un terzo fattore importantissimo entrava in gioco nella produzione dell'agglutinazione.

Bordet per primo riconobbe l'importanza che in questo fatto avevano i sali. Levaditi, in seguito constatò che gli animali immunizzati e trattati con iniezioni di soluzioni saline avevano un potere agglutinante molto più forte di quelli soltanto immunizzati. Joos, preoccupato di concludere per la natura chimica di questo fenomeno, dimostrò che privando completamente, mediante una prolungata dializzazione, il siero di un animale immunizzato e l'emulsione batterica del NaCl, in questi due liquidi normalmente contenuto, l'agglutinazione non avviene più. Egli dimostrò inoltre che, sebbene il fenomeno visibile dell'agglutinazione non si avveri, l'unione dell'agglutinina colla sostanza agglutinabile del microrganismo avviene ugualmente, ed una traccia di NaCl basta a render visibile il fatto.

Da ultimo il Levi della Vida con una serie di ricerche dimostrò che anche l'agglutinazione spontanea che si osserva nelle vecchie colture in brodo, o nelle emulsioni di microrganismi in soluzione fisiologica, è dovuta alla presenza di NaCl.

Appare da tutto ciò evidente l'importanza dei sali, e del NaCl in ispecie, nella genesi del fenomeno dell'agglutinazione, onde, per meglio definire, se fosse stato possibile, la funzione stessa del sale, intrapresi alcune ricerche.

***

Nella prima serie di esperienze ricercai se il NaCl iniettato in conveniente soluzione agli animali fosse capace di sviluppare nel sangue di questi il potere agglutinante. L'agglutinazione ottenuta con sostanze chimiche è da parecchio tempo nota.

Osservata prima dal Blachstein, che vide i vibrioni colerigeni agglutinarsi colla crisoidina, fu poi studiata da Beco, da Sobrazès e Brengues, e prima ancora da Malvoz, nel cui lavoro sono elencate diverse sostanze chimiche capaci di agglutinare i microrganismi.

Nessun autore parla però di potere agglutinante conferito al siero con l'iniezione di sostanze chimiche, se si fa eccezione per il Kôhler che vide il siero di sangue dei cani acquistare proprietà agglutinanti dopo 2-3 giorni dall'iniezione endovenosa di acido taurocolico al 10 %.

Per le iniezioni adoperai la soluzione al 2 % di NaCl purissimo in acqua distillata che fu sempre sopportata dai conigli senza inconvenienti di sorta anche quando ne iniettai 50 cc. in una sola volta. Come sito per la iniezione preferii la cavità peritoneale perchè là l'assorbimento è più rapido e più completo che nelle altre parti. Per mezzo di un taglio al padiglione dell'orecchio estraevo la quantità di sangue necessaria che immediatamente veniva centrifugata per la separazione del siero dal cougulo formatosi. Per il saggio dei sieri mi servii sempre di coltura in brodo di 5-6 ore al massimo perchè in essa, come osservò il Graziani, i microrganismi non sono ancora in notevole quantità, sono completamente isolati e mobilissimi. Le diluizioni del siero le facevo col brodo, la constatazione dell'agglutinazione coll'esame delle goccie pendenti un'ora dopo fatta la miscela di siero e di coltura. Consideravo agglutinata la coltura quando nella goccia in esame trovava 5 o più gruppi di bacilli ben distinti. I sieri furono sempre messi a contatto con 3 diversi microrganismi facilmente agglutinabili: il tifo, il coli ed il piocianeo provenienti tutti da tre campioni posseduti dal laboratorio.

TABELLA I.

Peso del coniglio	Quantità di Na Cl inoculato	Potere agglutinante del siero														
		Dopo 1 ora dall' iniezione			Dopo 6 ore dall' iniezione			Dopo 24 ore dall' iniezione			Dopo 30 ore dall' iniezione			Dopo 48 ore dall' iniezione		
grm.	grm.	tifo	coli	pioc.	tifo	coli	pioc.	tifo	coli	pioc.	tifo	coli	pioc.	tifo	coli	pioc.
950	0.40	1/300	1/200	1/300	1/300	1/200	1/300	1/75	1/50	1/75	..	..	..	..	..	..
876	0.40	1/400	1/250	1/400	1/400	1/275	1/400	1/100	1/50	1/100	1/50	..	1/50	..	..	..
1795	0.40	1/200	1/100	1/225	1/200	1/100	1/200	1/50	1/50	1/50	..	..	..	..	..	..
1005	0.40	1/300	1/250	1/300	1/300	1/200	1/300	1/100	1/75	1/100	1/25	..	1/25	..	..	..
855	0.40	1/350	1/175	1/350	1/300	1/150	1/300	1/75	1/50	1/75	1/25	1/25	1/25	..	..	..
2035	0.40	1/150	1/100	1/150	1/150	1/100	1/150	1/50	1/50	1/50	..	..	..	..	..	..
975	0.40	1/300	1/200	1/300	1/275	1/200	1/275	1/75	1/50	1/75	..	..	..	..	..	..
875	0.80	1/750	1/500	1/750	1/350	1/200	1/350	1/200	1/100	1/200	1/100	1/50	1/100	1/50	1/25	1/50
960	0.80	1/600	1/500	1/600	1/275	1/150	1/275	1/150	1/100	1/125	1/75	1/50	1/75	1/25	..	1/25
797	0.80	1/800	1/600	1/800	1/300	1/150	1/300	1/200	1/100	1/200	1/100	1/50	1/100	1/50	1/25	1/50
1025	0.80	1/500	1/300	1/525	1/300	1/125	1/300	1/175	1/100	1/175	1/100	1/25	1/100	1/25	..	1/25
980	0.80	1/600	1/350	1/600	1/400	1/275	1/400	1/125	1/125	1/125	1/75	1/50	1/75	1/50	1/25	1/50

Nella tabella I, sono esposti i risultati di questa prima serie di esperienze. Il NaCl iniettato in peritoneo provoca nel sangue dell'animale così trattato un potere agglutinante abbastanza elevato che compare già un'ora dopo l'iniezione. Questo potere, che si manifesta per microrganismi differenti in pressochè eguale maniera, è in rapporto col peso dell'animale e colla quantità di NaCl iniettata. I conigli n. 3 e 6 di peso doppio degli altri, pur avendo ricevuto la stessa quantità di sale, ebbero un potere agglutinante di circa la metà inferiore agli altri; gli ultimi 5 che ricevettero una dose doppia di NaCl ebbero tutti un potere agglutinante quasi doppio degli altri 7. Il potere agglutinante dura poco, fino a che cioè il NaCl viene eliminato dall'organismo, ed in proporzione decresce più rapidamente quanto maggiore è la dose del sale iniettato. I primi 7 conigli dopo 6 ore dall'iniezione non ebbero notevoli variazioni nel potere del siero, gli ultimi, nello stesso tempo, lo avevano già diminuito della metà. Rispetto al coli tutti i sieri ebbero un potere di quasi la metà inferiore che rispetto al tifo ed al piocianeo, ma in compenso l'agglutinazione era molto più chiara, i gruppi di bacilli più numerosi e composti di più elementi. Io non saprei spiegare questo fatto, pur costante col campione di coli posseduto dal laboratorio, che coll'ammettere la formazione nelle brodo-colture di particolari prodotti ostacolanti l'azione dei sieri.

Un fatto costante dell'agglutinazione ottenuta col NaCl, è la mobilità dei gruppi, che quasi mai sono formati da più di 10-12 bacilli.

***

In una seconda serie di esperienze volli vedere se, a pari quantità di sale, la concentrazione della soluzione avesse una qualche influenza. Nella tabella II sono esposti i risultati di questa seconda serie di ricerche. I conigli inoculati colla soluzione all'1 %, pur avendo ricevuto una dose abbastanza rilevante di sale, dopo un'ora agglutinavano soltanto nella proporzione di $^1/_{175}$, dopo 6 ore il potere era però di poco diminuito. Quelli trattati colla soluzione al 2.5 %, dopo un'ora possedevano un siero di alto potere agglutinante, ma che però, dopo 6 ore, era di già diminuito della metà. Nei primi due l'assorbimento del NaCl per la diluizione della soluzione e per la sua grande quantità (50 cc.), fu più lento e più duraturo, negli ultimi, l'assorbimento del sale più rapido per la concentrazione della soluzione, rese meno duraturo il potere agglutinante per la poca quantità della soluzione stessa.

TABELLA II.

Peso del coniglio in grammi	Quantità di Na Cl iniettata in grammi	Titolo della soluzione	Quantità di Na Cl per ogni grammo di peso nella unità di tempo in mmgr.	Potere agglutinante del siero					
				1 ora dopo l'iniezione		6 ore dopo l'iniezione		24 ore dopo l'iniezione	
				Tifo	Piocianeo	Tifo	Piocianeo	Tifo	Piocianeo
1005	0.50	1.0 %	0.49	1/150	1/150	1/125	1/125	1/75	1/75
975	0.50	1.0 %	0.51	1/175	1/150	1/175	1/150	1/75	1/75
880	0.50	2.5 %	1.42	1/450	1/450	1/275	1/275	1/50	1/50
920	0.50	2.5 %	1.36	1/375	1/375	1/225	1/225	1/50	1/50

Infatti ammesso che nell'unità di tempo i conigli trattati colla soluzione all'1 % assorbano gm. 0.50 di NaCl, quelli trattati colla soluzione al 2.5 % nella stessa unità di tempo assorbiranno gr. 1.25 di NaCl. Dividendo 0.50 per il peso dei due primi conigli (tabella II), ed 1.25 per il peso dei due ultimi, avremo la quantità di NaCl che ciascun animale aveva assoorbito per ogni grammo del peso del corpo.

Espressi in milligrammi i risultati, come si rileva dalla colonna IV della II tabella, sono i seguenti:

I. 0.49 — II. 0.51 — III. 1.42 — IV. 1.36

Questi dati e quelli esposti nella tabella II vanno perfettamente d'accordo. Fra i primi due la differenza di NaCl assorbito nell'unità di tempo è minima ed anche il potere agglutinante del siero è quasi eguale (1/150 — 1/175). Il terzo coniglio ha per ogni grammo del suo peso una quantità quasi tripla di NaCl, e triplo è anche il potere agglutinante del suo siero (1/450). Il quarto coniglio ebbe per ogni grammo una quantità di NaCl poco più di una volta e mezza maggiore dei primi due, ed il siero agglutinava una volta e mezza più di quello degli stessi due conigli.

Tutto ciò prova ancora una volta che l'agglutinazione ottenuta col NaCl è in istretto rapporto colla quantità del sale iniettato, e la sua durata ed intensità col tempo che l'organismo impiega ad assorbire e ad eliminare il sale stesso.

***

In una terza serie di esperienze ricercai se l'agglutinina che si ottiene col NaCl fosse un prodotto di reazione organica, o se la miscela, fatta fuori dall'organismo, di siero normale e di NaCl fosse capace di produrre tale fenomeno.

A tale scopo, pesato l'animale e calcolata la quantità del suo sangue che, come è noto, corrisponde ad $^1/_{13}$ circa del peso totale del corpo, estraevo col solito metodo una quantità stabilita di sangue (5 cc.) e ad essa aggiungevo la quantità di NaCl che avrebbe avuta dopo l'iniezione di gr. 0.80. Dopo l'aggiunta il sangue veniva centrifugato e col siero procedevo alle prove.

Nella tabella III sono esposti i risultati di questa esperienza. Da essa facilmente si rileva che il NaCl aggiunto al siero normale fuori dell'organismo provoca un potere agglutinante della pressochè identica forza che esso produce allorquando viene iniettato in peritoneo.

Il risultato di quest'ultima esperienza poteva lasciar credere che non solo l'organismo, ma anche il siero di sangue fosse estraneo alla produzione di questa agglutinina; si poteva supporre che soltanto il NaCl fosse causa di questo fenomeno, venendo i microrganismi a trovarsi in una soluzione salina di rilevante concentrazione. Occorreva perciò vedere se una soluzione acquosa che contenesse la stessa quantità di NaCl che veniva a trovarsi nel siero adoperato per la precedente esperienza avesse le medesime proprietà del siero stesso.

TABELLA III.

Peso del coniglio in grammi	Quantità del sangue in grammi	Quantità di sangue adoperata in cmc.	Quantità di NaCl aggiunto in grammi	Potere agglutinante del siero	
				Tifo	Piocianeo
1135	87.3	5	0.045	$^1/_{450}$	$^1/_{475}$
1590	122.3	5	0.032	$^1/_{525}$	$^1/_{525}$
965	74.2	5	0.053	$^1/_{475}$	$^1/_{475}$

Calcolati 1500 gr. come media di peso di un coniglio, esso possiede 115 gr. di sangue. Essendo gr. 0.90 %₀ la quantità di NaCl contenuta nel sangue, in tutta la massa di sangue la quantità di NaCl posseduta dal coniglio è di gr. 1.035. Dopo l'iniezione di gr. 0.80 il

contenuto totale in NaCl è di gr. 1.835. Presi gr. 115 di H^2O distillata e vi aggiunsi gr. 1.835 di NaCl e con questa soluzione, che avrebbe dovuto sostituire il siero, feci la prova dell'agglutinazione colla medesima tecnica delle precedenti esperienze. In nessun caso nemmeno nel rapporto di 1 a 15, di 1 a 20, riuscii mai ad avere la coltura agglutinata, anche attendendo per l'esame più di un'ora.

Da queste esperienze si può quindi trarre la conclusione essere il NaCl una sostanza che può produrre l'agglutinazione, ma non da sola; essa ha bisogno di combinarsi o semplicemente di unirsi al siero col quale, anche senza l'aiuto di forze vitali, può acquistare capacità di agglutinare i microrganismi. L'agglutinazione spontanea che si verifica nelle vecchie colture in brodo, od anche nelle emulsioni batteriche in soluzione fisiologica, non ha alcuna relazione coi fatti suesposti. In questi il NaCl agisce, fino ad un certo punto, come i prodotti solubili batterici che servono ad immunizzare; esso, unendosi o combinandosi col siero, agisce agglutinando microrganismi che nello stesso periodo di tempo non si sarebbero agglutinati spontaneamente. La contraddizione fra il fatto che i microrganismi si agglutinano spontaneamente in una soluzione salina al 0.90 % ed il fatto che in una soluzione di 1.83 % non ebbi alcuna agglutinazione, non è che apparente e trova la sua spiegazione nella differenza esistente fra il tempo in cui si verifica l'uno, ed avrebbe dovuto verificarsi l'altro.

***

In una quarta serie di esperienze volli vedere se le proprietà che caratterizzano le agglutinine specifiche, fossero o no comuni alla agglutinina ottenuta col NaCl.

Come si sa, un siero agglutinante conserva intatte le sue proprietà se viene portato ad una temperatura di 60°, perde invece ogni potere se la temperatura è di 70°, ed in essa, il siero viene mantenuto per un certo tempo. Inoltre (Berlioz) l'agglutinina dializza in H^2O distillata. Per ciò che riguarda il modo di comportarsi verso il calore, i risultati esposti nella tabella IV autorizzano a concludere che sotto questo rapporto niuna differenza esiste fra l'agglutinina ottenuta col NaCl e le agglutinine specifiche.

Per stabilire se vi fosse differenza nel modo di comportarsi verso la dializzazione, io potevo seguire la tecnica di Gengou che consiste nel misurare il massimo potere agglutinante del siero, prima di metterlo a dializzare e dopo un certo tempo ch'esso è nel dializzatore. Se il potere agglutinante è diminuito, la differenza fra i due risultati dà la quantità

di agglutinina dializzata. A me però non sembrò questo metodo sufficientemente esatto, specialmente poi quando dalla diminuzione del potere agglutinante del siero si voglia trarne una precisa misura dell'agglutinina dializzata. Infatti, se il livello esterno dell'acqua supera, sia pur di poco, il livello del siero contenuto nel dializzatore, è logico pensare che, per la nota legge fisica sui vasi comunicanti, l'acqua esterna penetri nell'interno del dializzatore facendo con ciò diminuire notevolmente il potere agglutinante del siero per l'avvenuta sua diluizione e ciò indipendentemente dalla quantità di agglutinina che può passare attraverso la membrana animale. Per queste considerazioni, e perchè a me bastava soltanto conoscere se l'agglutinina ch'io studiavo dializzava o no, io la ricercai invece nell'H^2O distillata.

TABELLA IV.

Peso del coniglio	Potere agglutinante del siero 1 ora dopo l'iniezione di gr. 0.80 di NaCl		Medesimo siero riscaldato per 15' a 60°		Medesimo siero riscaldato per 15' a 70°	
	tifo	piocianeo	tifo	piocianeo	tifo	piocianeo
gr. 1200 . . .	1/500	1/500	1/500	1/500	—	—
» 1356 . . .	1/475	1/475	1/475	1/475	—	—
» 950 . . .	1/625	1/625	1/625	1/625	—	—

Posto il siero nel dializzatore e messa a contatto la membrana colla più piccola quantità d'acqua possibile, dopo dodici ore provai il potere agglutinante dell'acqua, che naturalmente in origine non ne possedeva alcuno. A seconda della quantità del siero adoperata e dell'acqua sottostante, variava naturalmente il potere agglutinante ch'io trovavo nella acqua stessa, ma ad ogni modo lo trovai sempre oscillante fra $^1/_{25}$ e $^1/_{100}$, tanto cioè da poter concludere che anche l'agglutinina prodotta dal NaCl dializza facilmente in H^2O distillata.

Un'ultima proprietà delle agglutinine specifiche, mi rimaneva a vedere se fosse comune anche a quella ottenuta col NaCl. Già il Gruber trovò che le agglutinine del tifo e colera sieri sono esaurite dopo la reazione di contatto coi bacilli. Per le conclusioni alle quali arrivarono Hahn e Trommsdorf, Eisenberg e Volk, che confermarono questa osservazione, si può ritenere che i batteri stessi spoglino le agglutinine. Difatti i batteri che si sono una volta agglutinati, separati con un prolungato scuotimento, non si agglutinano più se vengono nuovamente messi a contatto coll'immun siero. D'altra parte se si centrifuga la miscela di siero e batteri, dopo avvenuta l'agglu-

tinazione, si pipetta il sovrastante liquido limpido, ed in esso si emulsionano nuovamente dei batteri, l'agglutinazione non si osserva più.

Emulsionai nel brodo una certa quantità di bacilli del tifo presi da una coltura in agar, e misurai il massimo potere agglutinante, verso questa emulsione, di un siero ottenuto colla solita iniezione di NaCl. In una provetta misi tante gocce di emulsione quante potevano essere agglutinate da una goccia di siero. L'esame in goccia pendente, un'ora dopo fatta la miscela, dimostrò che l'agglutinazione era avvenuta. Dopo 24 ore nel tubo vi era un abbondante precipitato fiocconoso, e la parte superiore del liquido era quasi limpida. Centrifugai finchè tutta la colonna di liquido divenne limpida e con una pipetta la trasportai in altra provetta. In essa emulsionai un'ansata di bacilli del tifo e nella provetta dove erano rimasti i bacilli agglutinati, rimisi del nuovo brodo, tanto quanto ne avevo levato, aggiungendo poscia una goccia di siero. Collo scuotimento prolungato ottenni in entrambi i tubi un intorbidamento uniforme; dopo 24 ore l'intorbidamento persisteva ancora e non vi era la menoma traccia di precipitazione.

Sarebbe forse bastata questa esperienza, più volte ripetuta, per dimostrare che anche i microrganismi agglutinati col siero di un animale trattato col NaCl, non sono capaci di agglutinarsi nuovamente, e che il liquido nel quale l'agglutinazione stessa è avvenuta perde ogni proprietà. In tutte le precedenti esperienze io usai sempre, per la constatazione dell'agglutinazione l'esame microscopico, essendomi sembrato questo mezzo, migliore e più esatto della semplice osservazione macroscopica. Per non discostarmi anche in questa esperienza dal metodo seguito nelle altre e per constatare con tutta esattezza questa importantissima proprietà dell'agglutinina ottenuta col NaCl, io rifeci l'esperienza seguendo la tecnica di Hahn e Trommsdorf.

Se è vero che i batteri spogliano le agglutinine, e se i sieri si esauriscono dopo aver provocato il fenomeno, mettendo a contatto un siero di noto potere agglutinante con dei batteri, e misurando dopo un certo tempo il potere di questo stesso siero, lo si deve trovare se non nullo, almeno grandemente diminuito.

TABELLA V.

Potere agglutinante del siero dopo l'iniezione di gr. 0.80 di NaCl	Ansate di bacilli del tifo emulsionate in 10 cc. di siero	Potere agglutinante del siero centrifugato dopo 12 ore di contatto col b. di tifo	Potere agglutinante del siero testimonio dopo 12 ore dall'estrazione
1/450	4	1/75	1/450
1/375	5	1/25	1/375
1/475	6	1/50	1/475

Fatta l'iniezione di gm. 0.80 di NaCl ad un coniglio, dopo circa un'ora e mezza, dall'arteria femorale, raccolsi una notevole quantità di sangue. Misurai esattamente il potere agglutinante del siero così ottenuto verso una coltura di tifo di 6 ore, e dopo emulsionai nel siero una notevole quantità di bacilli del tifo da una coltura in agar. Posi la provetta contenente l'emulsione in termostato a 37° assieme ad un'altra contenente piccola quantità di siero senza microrganismi. Dopo 12 ore centrifugai la emulsione e misurai una seconda volta il potere del siero.

Come si rileva dalla tabella V, il siero col quale erano rimasti a contatto i bacilli aveva un potere agglutinante nullo o quasi, l'altro conservava inalterato il primitivo potere. Potevo quindi con sicurezza concludere che il siero agglutinante che si ottiene dal coniglio dopo un'iniezione di NaCl si esaurisce dopo aver provocato l'agglutinazione dei batteri, che fissano l'agglutinina rendendo così il siero inattivo ed essi stessi incapaci di riagglutinarsi.

***

In un'ultima serie di esperienze ricercai come si comportava un animale immunizzato per un dato microrganismo rispetto all'agglutinina che in esso si sarebbe formata per l'iniezione della soluzione salina.

Come già dissi, Levaditi provò che gli animali immunizzati e trattati con soluzioni di sali minerali, raggiungono nello stesso tempo un potere agglutinante molto più elevato di quelli semplicemente immunizzati.

Io rifeci l'esperienza estendendola anche agli immunizzati per il tifo oltre che per il piocianeo. I dati esposti nella Tabella VI autorizzano alle seguenti conclusioni: negli animali immunizzati per il tifo e per il piocianeo le iniezioni saline rafforzano ed innalzano il

potere agglutinante, ma se la dose del sale iniettato è rilevante, questo potere non è più specifico per il bacillo che servì all' immunizzazione, ma si esercita anche sopra microrganismi differenti che prima della iniezione non venivano agglutinati. Pare che il NaCl non possa servire a rafforzare l'agglutinina specifica che si è formata nell'organismo colla inoculazione delle tossine, che fino ad un certo limite, al di là del quale il NaCl iniettato rimane, per così dire, in eccesso ed agisce per conto proprio producendo un potere agglutinante indifferente per microrganismi diversi.

TABELLA VI.

Peso del coniglio	Specie del microrganismo per cui fu immunizzato	Potere agglutinante del siero		Iniezione di NaCl	Potere agglutinante del siero	
		tifo	pioc.		tifo	pioc.
Gr. 1256	Tifo	1/800	— 1/25	Gr. 0.80	1/1200	— 1/25
» 875	Tifo	1/050	— 1/25	» 1.50	1/1050	1/125
» 988	Tifo	1/875	— 1/25	» 1.50	1/1125	1/100
» 950	Piocianeo	— 1/25	1/1000	» 1.50	1/125	1/1225
» 1085	Piocianeo	— 1/25	1/775	» 1.50	1/75	1/1050

NB. Il segno — indica la mancanza dell'agglutinazione in quel rapporto fra siero e cultura.

Conclusioni.

1. Le iniezioni endoperitoneali di soluzioni acquose di NaCl conferiscono al siero di sangue del coniglio un potere agglutinante verso i microrganismi agglutinabili, proporzionale alla quantità di sale iniettata ed alla concentrazione della soluzione.

2. La permanenza nel siero del potere agglutinante è in rapporto diretto colla quantità di sale usata, ed in rapporto inverso alla concentrazione della soluzione.

3. L'agglutinina formata dal NaCl nel sangue resiste ad una temperatura di 60° e rimane distrutta a 70°.

4. Dializza in H^2O distillata.

5. Il siero che ha servito una volta ad agglutinare dei microrganismi perde ogni proprietà, ed i microrganismi agglutinati, se vengono separati, non si riagglutinano più.

6. Le iniezioni di NaCl rafforzano il potere agglutinante specifico di un coniglio immunizzato, ma se la dose del sale iniettato supera un certo limite, compare nel siero, a lato del potere agglutinante specifico, il potere agglutinante per ogni microrganismo.

***

Quali deduzioni si possono fare da queste conclusioni, e quale è, nel fenomeno dell'agglutinazione, la parte che spetta al NaCl e quale all'organismo? Non possiamo naturalmente che muoverci nel campo delle ipotesi e riferirci sempre al coniglio da me adoperato per l'esperimento.

Pare che esista una sostanza nel siero normale che, se si trova in presenza di eccesso di NaCl, può combinarsi con esso e dare al siero il potere agglutinante indipendentemente da qualsiasi intervento di reazione organica.

Così la proprietà agglutinante di varia intensità verso tutti, o quasi, i microrganismi, che i sieri normali posseggono, può trovare la sua spiegazione nel fatto che nei sieri stessi può esistere una certa quantità in eccesso di NaCl introdotta cogli alimenti, la quale viene fissata dalla sostanza presente nel siero. Questa, quindi, o combinandosi col NaCl o forse soltanto agendo in presenza del sale stesso, dà al siero quel potere agglutinante che non è mai stabile, ma che oscilla perchè l'eccesso di NaCl nel siero è infatti variabile secondo le condizioni di alimentazione e di rapidità di secrezione.

La sostanza specifica che produce l'organismo durante l'infezione, o quando già sia stato immunizzato, si combina con questo gruppo formato dal NaCl e dalla non determinata sostanza normale del siero, ed impedisce che l'agglutinazione si eserciti verso altri microrganismi. L'organismo generalmente produce la sostanza agglutinante specifica in quantità superiore a quella che può combinarsi col gruppo dato dal siero e dal NaCl esistente nel plasma, tanto è vero che iniettando del nuovo sale, che alla sua volta entra in rapporto colla suddetta comune sostanza normale del siero, vediamo l'agglutinazione specifica aumentare. Quando però tutta la sostanza specifica prodotta dall'organismo ha fissato quello che si può chiamare il gruppo agglutinogeno che risulta dal rapporto che viene a stabilirsi fra il NaCl e la sostanza normale del siero, se introduciamo nuovamente del NaCl, esso si unisce soltanto con questa ultima, ed a lato dell'agglutinazione specifica vediamo comparire anche l'agglutinazione per altri microrganismi. Pare quindi che al NaCl spetti principalmente di dare la proprietà agglutinante, all'organismo la specificità del fenomeno, e questa deduzione, che si fa con tutte

le riserve, trova un appoggio dal fatto asserito da Joos, che, cioè, in assenza di NaCl, non si produce neppure l'agglutinazione specifica, e dal fatto ancora che col NaCl noi possiamo far comparire nel sangue un'agglutinina che ha tutte le proprietà che caratterizzano le agglutinine del siero di un animale immunizzato.

In ogni modo, qualunque sia la spiegazione che si vuol dare del fenomeno, e volendo uscire dall'elemento sperimentale « coniglio », da questa speciale azione agglutinogena notata, potrebbe trovare un altro appoggio, se non spiegazione, il fatto da molti ammesso che il cloruro di sodio nell'alimentazione favorisce la resistenza generica alle infezioni.

BIBLIOGRAFIA.

Beco. *Recherches sur la valeur de l'agglutination par la formaline et le serum des typhysés en tant que moyen de diagnostique entre le bacillus thyphosus et le coli-bacille.* Bulletin de l'Académie royale de médecine de Belgique, 1898, n. 4.

Berlioz. *Bactériologie médicale.*

Blachstein. *Verhalten des Chysoidins gegen Choleravibrionen.* Münchener medicin. Wochenschrift, 1896.

Bordet. *Le mécanisme de l'agglutination.* Ann. Pasteur, 1899.

Eisemberg e Volk. *Untersuchungen über die Agglutination.* Zeitschrift für Hygiene, 1902, v. 40.

Gengou. *Etudes sur le rapport entre les agglutinines et les lysines du charbon.* Ann. Pasteur, vol. 40.

Graziani. *Influenza della temperatura ambiente c bagno freddo sulla produzione di sostanza agglutinante negli animali immunizzati per il tifo.* Gazzetta degli Ospitali, 1906.

Gruber. *A theory of active and passive immunity from the bacteria of cholera typhoid fever and the lake.* Lancet, 1897.

Hahn e Trommsdorf. *Ueber agglutinine.* Münchener medicin. Vochenschrift, 1900.

Joos. *Ueber die Bedeutung anorganicher Salze für die Agglutination der Bakterien Centralblat für Bakt.* 1901, vol. 30.

Joos. *Untersuchungen über den Mechanismus der Agglutination.* Zeitschrift für Hygiene, 1901, vol. 36.

Levaditi. *L'action des sels sur l'organisme au point de vue de la génèse des propriétés agglutinatives.* Comptes-rendus de la Société de Biologie, 1899.

Levi della Vida. *Sul fenomeno dell'agglutinazione spontanea di alcuni batteri nelle soluzioni saline.* Questi Annali, vol. XV, 1905.

Malvoz. *Agglutination par des substances chimiques.* Ann. Pasteur, 1867.

Sobrazès e Brengues. *Agglutinines chimiques.* Comptes-rendus de la Société de Biologie, 1899.

Istituto zoologico della R. Università di Roma

Sopra una epizoozia ne' piccioni da "Heterakis maculosa" (Rud)

per il dott. GIULIO ALESSANDRINI
incaricato della Parassitologia presso l'Istituto d'Igiene.

(Con la Tav. XII).

In Oriolo Romano e nella colombaia del principe Altieri si manifestò tempo fa una straordinaria mortalità nei piccioni. Alcuni di essi, dopo un periodo più o meno lungo di inappetenza, di svogliatezza e sonnolenza, erano colti da diarrea e, dimagrando a vista d'occhio, così almeno mi fu riferito, morivano alle volte in mezzo a convulsioni. Altri invece nell'apparente vigore delle forze, dello sviluppo e della nutrizione, morivano improvvisamente come colti da apoplessia.

Questo fatto fu quello che impressionò maggiormente il proprietario, il quale mi volle far vedere un individuo deceduto istantaneamente il giorno prima. Il piccione di cui feci l'autopsia era uno adulto, abbastanza ben nutrito e bene sviluppato. Aperta la cavità addominale, vi riscontrai una forte quantità di sangue raggrumato che era, senza dubbio, fuori uscito da una lacerazione della curva inferiore del duodeno. Da questa apertura eran venuti fuori anche numerosissimi nematodi che, vivi ancora, si trovavano in mezzo al grumo sanguigno e avevano invaso tutta la cavità addominale. Il duodeno ci presentava la sua branca discendente vuota, con pareti flaccide e sottili, mentre la branca ascendente aveva le pareti enormemente distese, lucenti, così assottigliate da lasciar trasparire gli innumerevoli parassiti che si stipavano all'interno.

La lacerazione che si presentava nella curvatura inferiore e che, partendo dall'angolo interno, si estendeva per circa 2 centimetri in

basso, occupava quasi la metà della circonferenza del duodeno stesso, il quale anche in questo punto era a pareti flaccide e trasparenti. Le labbra della ferita erano sfrangiate e tenute aperte dai parassiti che, ancora vivi, uscivano da essa. Gli altri organi erano tutti perfettamente normali. Nulla nell'encefalo e nel midollo spinale: nulla nel fegato, nei polmoni, nel peritoneo, nel tratto respiratorio. Nulla, quindi, all'infuori della lacerazione e della consecutiva emorragia, poteva spiegare la morte, la quale, a mio avviso, deve essere stata causata da *schock* del sistema nervoso, tanto più che, trovandosi il peritoneo normale, non si poteva nemmeno pensare ad una peritonite da perforazione. In pari modo non poteva pensarsi ad altre malattie acute dei colombi essendone assolutamente mancati i sintomi e non essendovi lesioni anatomiche che, anche lontanamente, le giustificassero.

La lacerazione poi fu senza dubbio una conseguenza diretta della enorme distensione prodotta dai vermi, i quali erano tanto numerosi e così ammassati, che rimasi impressionato e volli contarli.

Vuotato tutto il tratto duodenale ed il principio dell'intestino, ove solo riscontrai i parassiti, potei raccogliere mille quattrocento settanta (1470) esemplari di *Heterakis maculosa* (Rud). Ora, se si pensa che questi nematodi sono abbastanza grandi (i maschi misurano da 16 a 25 mm.: le femmine da 20 a 35 mm., con un diametro di circa mm. 0.5 a mm. 0.8) sarà facile immaginare che essi rappresentavano un bel volume, con un peso netto di circa 10 grammi. Visto l'interesse del caso, pregai il proprietario di volermi far pervenire gli altri piccioni che fossero morti nelle stesse condizioni. Pochi giorni dopo infatti mi fu portato un altro individuo, anch'esso in buone condizioni esteriori, il quale, senza presentare altre lesioni anatomiche, aveva tutto il tratto duodenale ed il principio dell'intestino letteralmente infarcito di *Heterakis*.

Anche in questo individuo la morte subitanea doveva essere avvenuta per *schock* da lacerazione dell'intestino, la quale, come ben si può vedere (fig. 1), è situata circa la metà della branca discendente del duodeno e la interessa per circa 3 centimetri, dei quali due nel tratto di parete visibile ed uno nel tratto interno.

La porzione dell'intestino occupata dai parassiti è straordinariamente dilatata e, confrontando le misure di essa con la media che si può ottenere da intestini di piccioni sani, si ottengono i seguenti risultati:

	Piccione sano (1)	Piccione malato
Diametro del duodeno.	mm. 6.3	mm. 18.4
Circonferenza nel punto corrispondente alla lesione	» 20	» 59
Circonferenza nella curvatura inferiore . .	» 20	» 53
Circonferenza nella branca ascendente . .	» 20	» 50
Circonferenza nel primo tratto dell'intestino	» 18	» 42

L'intestino, oltrepassata la curvatura posteriore al disotto del lobo destro del fegato, nel quale si nota un nodo molto serrato di parassiti, è perfettamente normale, come normali sono tutti gli organi addominali, ad eccezione del pancreas che è anch'esso lacerato nel punto corrispondente alla lesione. L'encefalo, il midollo spinale non ci offrono nessuna alterazione. Esaminate con attenzione le feci si trovano ricchissime di uova di questi parassiti tanto che in ogni campo del microscopio (obb. 2 oc. 3 Koritska) se ne possono contare da 25 a 40 (fig. 2 e 3). Esse sono ovalari e misurano da 75 a 90 μ nel diametro longitudinale per uno trasversale di 40×50 μ. Il loro guscio è spesso con la superficie leggermente scabra. Miste alle uova si trovano scarsissime forme larvali in vario periodo di sviluppo (fig. 4).

Per conservare il pezzo anatomico da cui ho tratto la fotografia, non ho potuto nè contare il numero di parassiti, nè fare dei preparati microscopici, cosa che mi ero proposto di eseguire nel caso mi fossero stati inviati altri individui. Ma non me ne furono portati più, giacchè seppi che furono prese subito quelle misure energiche, curative e preventive che io stesso suggerii.

***

L'elmintiasi da *Heterakis maculosa* (Rud) non è rara nei piccioni e già fin dal principio del secolo scorso, Lorenzo Heister e Gebauer parlano di morte rapida per presenza di una grande quantità di questi parassiti. In seguito Unterberger, Ercolani, Bassi, Generali, Perroncito, Brusasco, Knauer, Mégnin ed altri parlano di questo verme, riportano casi clinici dovuti al parassitismo di esso, descrivono le lesioni, la sintomatologia, diagnosi e cura, e qualcuno (Brusasco) dice che non sono rari i casi di perforazione dell'intestino, special-

(1) La media fu ottenuta da misure praticate su venti esemplari perfettamente sani ed adulti.

mente della punta de' ciechi; ma nè essi nè altri autori hanno mai riscontrato casi in cui fosse così grande il numero di questi nematodi. Unterberger (1) fu quegli fra i primi, che descrisse meglio questa malattia, che richiamò l'attenzione su di essa, e che si occupò anche della biologia del parassita. Dimostrò, infatti, che l'embrione è già bene sviluppato dopo 17 giorni, quando le uova si tengono in un ambiente umido, e con una serie di esperienze vide che gli embrioni, solo in questo periodo, dopo cioè esser rimasti per circa questo tempo nell'ambiente esterno, sono capaci di infestare i piccioni sani, nell'intestino de' quali in tre settimane raggiungono la maturità sessuale. Vide anche che, somministrando ad individui immuni uova appena emesse dall'utero, queste erano restituite con gli escrementi.

Le esperienze dell'Ercolani (2) sopra lo stesso parassita non sarebbero però perfettamente consone a quelle dell'Unterberger. Infatti quegli ammette la dimorfobiosi dell'*Heterakis* e crede che nè le uova emesse dai vermi intestinali, nè gli embrioni nati da quelle, nè questi, divenuti adulti e viventi vita libera, possono far ritorno diretto allo stato di nematodi intestinali.

In ogni modo però oggi dai più sono accettate le conclusioni dell'Unterberger e si ammette che l'infestione sia diretta. Un piccione è capace con i propri escrementi, ricchissimi di uova, di infestare una intera colombaia, e gli individui sani contraggono il male sia con l'acqua, sia con gli alimenti insudiciati da escrementi di malati.

Ora, se si tiene conto dello straordinario numero di uova che è capace di emettere un piccione malato durante le 24 ore (Unterberger calcola approssimativamente 12,000), e se si tiene conto del breve tempo che occorre perchè la nuova generazione sia capace di riprodursi (38 giorni circa) si immagina facilmente quale accumulo di uova può trovarsi, dopo brevissimo tempo, in una colombaia, che non corrisponda alle scrupolose norme igieniche, e quale continuo pericolo di infestione corrano i piccioni che in essa si trovano, malgrado le enormi perdite che si produrranno naturalmente nelle uova e negli embrioni stessi.

Questa epizoozia è quindi molto nefasta per i colombi, i quali a quanto pare, in seguito all'osservazione del Kasparek (Centr. f. Bakter. Paras. I Abth. 1902, pag. 245), vanno anche soggetti ad in-

(1) Unterberger. Oesterr. Vierteljahrssch. f. wissensch. Veterinärkunde, 1868 (Journal de méd. vétérin., Lyon, 1869. — Archivio della veterinaria italiana, 1870).

(2) Ercolani, *Osservazioni sulla vita libera dell' « Ascaris maculosa »*, Rud. Mem. Accad. sc. Istit. Bologna, serie III, tom. VII, 1877.

festioni da *H. perspicillum* (Rud) che normalmente vive nell'intestino dei gallinacei. In questo caso illustrato dal Kasparek, si rinvenne all'autopsia emaciamento straordinario, il cuore, i polmoni e lo stomaco normali, la cavità addominale piena di gran quantità di siero: i vasi mesenterici iperemici, tutto il tratto intestinale fortemente dilatato specialmente il cieco ed il colon, che raggiungeva cm. 1 ¼ di diametro ed aveva la superficie rilucente rosso-cupo violaceo.

Queste alterazioni più o meno corrispondono a quelle che dànno tutti gli autori per l'elmintiasi da *H. maculosa*, la quale è senza dubbio in relazione: con la sottrazione del materiale nutritivo, con la tossicità di questi parassiti, la quale non deve certo essere inferiore a quella che è dimostrata per gli Ascaridi: con l'alterazione che si produce nella mucosa per l'accumulo straordinario di essi e per i loro continui movimenti, alterazione che può anche favorire l'azione patogena di quei microrganismi che si riscontrano sempre anche nell'intestino sano, e che, in condizioni normali, trovano una barriera insormontabile nell'epitelio intestinale integro.

Nei casi da me riscontrati poco o nulla di tutto questo.

I piccioni all'occhio dell'allevatore non avevano presentato mai nessun sintomo che facesse supporre la loro grave infestione. Essi avevano l'apparenza di essere sani in tutte le estrinsecazioni della loro vita, ed anche la autopsia, all'infuori della lacerazione, non mise in rilievo nessuna altra alterazione che potesse invocarsi come causa di morte.

E mentre nella maggior parte dei casi la sintomatologia è in relazione con l'infestione lenta e continua, nei casi miei, l'infestione straordinariamente abbondante, e quasi simultanea (gli esemplari che ho potuto esaminare sono presso a poco tutti nello stesso grado di sviluppo), deve aver prodotto dei sintomi diversi che sono sfuggiti agli osservatori, giacchè non saprei davvero spiegare come si possa arrivare ad una distensione dell'intestino così eccezionale da produrne la rottura, senza che il piccione ne abbia risentito alcun fastidio. Senza dubbio lo sviluppo di questi vermi è stato contemporaneo o quasi e deve essere avvenuto in sito per una ostruzione prodottasi nella curvatura posteriore dell'intestino al disotto del fegato, e causata forse da un gomitolo di parassiti provenienti da una infestione antecedente a quella che fu causa poi della lesione e della morte.

***

Non mi fermerò qui a parlare dei sintomi e della cura della malattia ciò che può leggersi nei vari trattati di zoologia medica di parassitologia o di patologia comparata (Railliet, Neumann, Perroncito,

Mégnin, Brusasco, Cadeac, ecc.), ma dirò solo qualche cosa della profilassi di tale affezione parassitaria, che può presentarcisi alle volte sotto forma di vera epizoozia capace di arrecare la distruzione rapida di intere colombaie o diminuire enormemente il valore commerciale e riproduttivo dei colombi stessi.

Da quanto abbiamo esposto sopra si comprende facilmente che i piccioni si infestano con gli alimenti e con le bevande e bisogna quindi evitare in ogni modo che ciò avvenga. Quindi bisogna attenersi alle seguenti prescrizioni.

Il cibo non deve *mai* e per *nessuna* ragione essere somministrato agli animali per terra in mezzo alla colombaia. Molto ne andrebbe perduto e quello che non si perde si mescola facilmente alle deiezioni. Si deve somministrare in mangiatoie adatte. Poco importa adottare un modello piuttosto che un altro. Con esse si deve raggiungere lo scopo di presentare ai colombi il cibo poco per volta, sempre pulito, nell'impossibilità di imbrattarsi; debbono essere quindi costruite in modo che esso non sia disperso e deve essere presentato agli animali da piccoli pertugi, dove possano mettere facilmente la testa, ma dove assolutamente non possano defecare. In questo modo si raggiunge anche lo scopo di poter somministrare ai piccioni quella qualità e quantità di cibo giornaliero che si desidera o che si crede necessario.

Un'altra avvertenza è da seguire: occorre mescolare sempre allo alimento del salgemma e dei gusci d'uovo triturati. Questi forniscono la sostanza calcarea di cui v'è bisogno per la formazione del guscio delle uova e le femmine, trovandola sempre alla loro portata, non andranno a cercarla altrove.

Il salgemma oltre ad avere un'azione molto benefica sulla salute dei piccioni, ha un potere non indifferente sulla distruzione delle forme giovanili degli elminti.

L'*acqua* anche essa non deve esser messa in recipienti a bocca larga e senza copertura, perchè non si insudici con gli escrementi. Deve essere fresca, limpida, pura e cambiata almeno ogni 24 ore e somministrata in abbondanza tanto più che è noto che i piccioni bevono molto. Non consiglierei di far correre l'acqua, come si usa in certe colombaie, in un rigagnolo praticato nel pavimento. E' bene invece usare abbeveratoi speciali.

Il migliore e più economico modello è quello in terra cotta a forma di pera con 3 o 4 o più aperture praticate in basso in modo che il piccione possa bere comodamente. L'acqua vi si mantiene pura e fresca e non si altera facilmente, come accade con abbeveratoi di metallo. L'unica avvertenza da usare è quella di tenere l'apertura supe-

riore sempre coperta in modo che gli animali, posandovisi sopra, non possano, defecando, imbrattare l'acqua sottostante.

Il *pavimento*, le *mura*, i *nidi* debbono possibilmente essere lisci, imbiancati con calce e costruiti senza angoli, in modo che possano facilmente lavarsi e le scabrosità o gli angoli non diano facile e adatto asilo ai parassiti o alle loro uova. Si deve anche avere l'avvertenza che il materiale adoperato, specie per il pavimento, assorba facilmente l'acqua che potrebbe versarvisi, ed impedire che l'ambiente umido favorisca lo sviluppo delle uova dei vermi.

Se poi, malgrado tutte le precauzioni prese, si sviluppasse questa elmintiasi in una colombaia, bisogna assicurarsi con l'esame delle feci se vi sono piccioni sani e separarli rigorosamente dai malati. Questi debbono esser curati, nello stesso tempo che si deve procedere alla più scrupolosa pulizia della colombaia non solo, ma di tutti gli oggetti che in essa si trovano e ove fosse possibile, dopo aver tutto imbiancato con acqua di calce o lavato con soluzioni disinfettanti, lasciare i locali deserti per qualche tempo, perchè la siccità completi la distruzione delle uova.

Annali d'Igiene sperimentale, Vol. XVII (1907).
Tav. XII.

G. Alessandrini.
Sopra una epizoozia da „Heterakis maculosa" (Rud).



Fig. 1.



Fig. 2.



Fig. 3



Fig. 4.

ISTITUTO D'IGIENE DELLA R. UNIVERSITÀ DI ROMA

Sulla probabile costituzione chimica della diastasi presamica

di ALBERTO SCALA,
aiuto nell'Istituto d'igiene della R. Università di Roma.

Nell'ultima mia nota, sullo stesso argomento (1), potei concludere che la diastasi presamica non sia altro che una base formata di un nucleo albuminoide e di un certo numero di gruppi ammidici laterali ai quali detti il nome di gruppi attivi. E pervenni a questa conclusione: primo, perchè in ogni decomposizione della diastasi si otteneva ammoniaca; secondo, perchè la diastasi presentava i caratteri di una vera albumosa; terzo, perchè il mercurio rendeva insolubile la diastasi per sostituzione degli idrogeni dei gruppi ammidici laterali, facendo perdere ad essa, in tutto od in parte, il potere coagulante, a seconda che in tutto od in parte erano stati combinati i gruppi ammidici laterali.

L'ammoniaca però, che si separava nella decomposizione, fu identificata colla reazione di Nessler, la quale, sebbene specifica, sensibile e sicura, aveva bisogno della sanzione quantitativa, per avere nella questione tutto il peso necessario.

Arrivare a questo non era facile impresa con materie albuminoidi, sempre oscure nel loro comportamento e, per di più, con una diastasi, che non può essere in alcun modo depurata, senza toglierle la proprietà che interessa di conservarle. Quindi, più che di un metodo di determinazione assoluto, ho dovuto contentarmene di uno relativo, il quale, operando sempre nelle identiche condizioni, può dare risultati egualmente chiari e concludenti.

Ho sciolto perciò una certa quantità di diastasi, precipitata con solfato d'ammonio, dializzata e seccata prima in bagnomaria a 38°, poi nel vuoto su cloruro di calcio, in 200 cmc. di acqua distillata. In 25 cmc. di questa soluzione ho determinato l'ammoniaca totale, decomponendo la diastasi

(1) *Staz. agr. sper. ital.*, vol. 36, p. 941.

per corto riscaldamento in bagnomaria bollente e facendo essiccare la soluzione ad una temperatura non superiore a 35°, per evitare ogni ulteriore decomposizione della parte nucleare della diastasi stessa. Il residuo secco l'ho trattato direttamente con 10 cmc. di soluzione satura di cloruro mercurico, il quale rendeva insolubile quasi tutta la diastasi e qualche altra albumosa eventualmente presente. Ho preferito di operare così perchè in soluzione acquosa la precipitazione sarebbe stata incompleta e la diastasi rimasta in soluzione avrebbe disturbata la determinazione grandemente. Ho filtrato per piccolo filtro a pieghe ed ho lavato più volte consumando in tutto 25 cmc. di acqua distillata. Nel filtrato precipitavo il mercurio con idrogeno solforato, scaldavo, per eliminare l'eccesso di questo, e determinavo l'ammoniaca. Cioè, versavo il liquido, senza filtrarlo, in un pallone, ove si trovava dell'acqua e dell'ossido di magnesio, esenti ambedue di ammoniaca, congiungevo con un refrigerante e distillavo. Il distillato si raccoglieva in apparecchio chiuso, quale si usa per le determinazioni di azoto col Kjeldhal, contenente soluzione diluita di acido cloridrico. E raccoglievo sempre la stessa quantità di distillato, affine di evitare la decomposizione della materia albuminoide. che ancora poteva trovarsi nel liquido in esame, e che avrebbe potuto dare ammoniaca per lunga ebollizione. Perciò, se decomposizione ci fosse stata, essa avrebbe dovuto rimanere costante in ogni determinazione.

L'ammoniaca nel distillato è stata determinata nella forma di cloroplatinato, per avere risultati più certi, poichè questo è circa 5 volte il peso dell'ammoniaca che contiene.

In altre porzioni di 25 cmc. ho cercato di produrre, per riscaldamento moderato, non già la decomposizione totale della diastasi, ma parziale, ed ho determinato l'ammoniaca, sotto forma di sale ammoniacale che esisteva nella diastasi e che si era prodotto per decomposizione della diastasi stessa.

I risultati ottenuti e che rappresentano la media di varie determinazioni si trovano raccolti nelle tabelle seguenti:

INDICAZIONI	Soluzione intatta	Riscaldata a 60° per 5 minuti	Riscaldata a 60° per 4 minuti
Potere coagulante iniziale: 1 cc. in 100 cc. di latte a 40°. Minuti secondi	105	130	60
Potere coagulante ridotto. Minuti secondi	..	215	155
Ammoniaca totale %.	1.3850	1.3850	1.3850
Ammoniaca dei sali ammoniacali. .	1.1428	1.2318	1.2433
Ammoniaca ammidica	0.2422	0.1532	0.1417

INDICAZIONI	Soluzione intatta	Riscaldata tra 65°-70° per 5 minuti	Riscaldata tra 50°-55° per 2 minuti
Potere coagulante iniziale: 1 cc. in 100 di latte a 40°. Minuti secondi.	20	20	20
Potere coagulante ridotto. Minuti secondi	..	perduto	110
Ammoniaca totale %.	0.427	0.427	0.427
Ammoniaca dei sali ammoniacali. .	0.408	0.409	0.414
Ammoniaca ammidica	0.019	0.018	0.013
Potere coagulante della diastasi: 1 cc. in 100 di latte a 40°. Minuti secondi.	65	65	65
Potere coagulante ridotto. Minuti secondi	..	perduto	180
Ammoniaca totale %.	0.93	0.93	0.93
Ammoniaca dei sali ammoniacali. .	0.58	0.59	0.72
Ammoniaca ammidica	0.35	0.34	0.21

Nel primo esperimento la diversità del potere coagulante iniziale nelle tre determinazioni proviene dall'avere usato tre campioni di latte diversi. Poichè il presame ha un'azione varia sia sul latte dello stesso animale in giorni diversi, sia sul latte misto, per condizioni che nel momento non si possono definire; mentre nello stesso latte una stessa soluzione di presame produce sempre gli stessi effetti. Ciò però non produce inconveniente quando si tenga conto delle differenze tra il potere coagulante della soluzione presamica integra e modificata, poichè dovranno presentare tra loro sempre una stessa relazione.

In ogni modo i risultati delle determinazioni dimostrano che ogni volta che nella diastasi si ha una decomposizione, si ha anche un aumento nella quantità dei sali ammoniacali ed una diminuzione dell'ammoniaca ammidica.

Oltre a ciò, quasi a dimostrare l'esattezza del metodo, ogni volta che per il riscaldamento è stato completamente distrutto il potere coagulante della diastasi, la quantità dell'ammoniaca dei sali ammoniacali è quasi perfettamente corrispondente a quella totale. Ciò di-

mostra altresì che la perdita del potere coagulante ha sempre per conseguenza la eliminazione della stessa quantità di ammoniaca.

La non corrispondenza tra l'ammoniaca ammidica ed il potere coagulante nei tre campioni è dipendente dalla qualità del latte usato, di cui è stato dianzi parlato, poichè le tre esperienze sono state fatte necessariamente in tempi diversi. Oltre a ciò non si trova corrispondenza tra il riscaldamento e la entità della decomposizione, perchè le condizioni della soluzione diastasica non erano certamente identiche, sopratutto per la maggiore o minore acidità. Così talvolta si può riscaldare una soluzione per 5 minuti a 60° alterandosi solo poco, tal'altra invece lo stesso riscaldamento la decompone completamente. Ed è per tutte queste circostanze che è necessario procedere con tanta cautela, affinchè le determinazioni ed i confronti non servano a svisare la realtà.

La sostanza basica che si separa nella decomposizione del presame, è stata indicata come ammoniaca, perchè dava nettissima la reazione di Nessler. Le determinazioni quantitative fatte sulla base ottenuta per riscaldamento della diastasi, depurata per precipitazione con cloruro mercurico e per precipitazione con cloruro di sodio, lo dimostrano all'evidenza: difatti, in 4 campioni di cloropatinato ho determinato il platino ed ho ottenuto i risultati seguenti:

Pt trovato	Pr calcolato per $Pt\,Cl^4\,(NH^4)^2$	Per cento
—	—	—
0.1180	0.1210	97.52
0.5060	0.5130	98.63
0.4110	0.4160	98.70
0.8060	0.7986	101.00
	Media . . .	**98.98**

Quindi nessun dubbio mi sembra che si possa avanzare ancora sulla eliminazione di una base alcalina nella decomposizione del presame, e che questa base sia l'ammoniaca.

Però si può sempre, per ipotesi, ammettere che la diastasi, per il solo riscaldamento ad una temperatura superiore a 60° e per un tempo più o meno lungo, subisca una modificazione molto più profonda di quel che non sia il distacco puro e semplice dei gruppi ammidici laterali e la sostituzione degli ossidrili. In tale ipotesi, l'ammoniaca non sarebbe che uno dei prodotti di decomposizione e forse il meno importante ed il più appariscente.

Questa ipotesi apparisce poco probabile perchè un'albumosa, quale è la diastasi presamica o quale almeno pare che sia, non si decom-

pone, semplificando la propria molecola, per un'azione così blanda di un riscaldamento a 60° o poco sopra 60°. E difatti una soluzione di diastasi presamica, preparata sciogliendo nell'acqua distillata un presame depurato per precipitazione con solfato d'ammonio, è stata riscaldata fino ad 80° per decomporla interamente. Ciò che in realtà è avvenuto, perchè essa non coagulava più il latte nemmeno dopo molte ore. Questa soluzione è stata allora saturata con solfato d'ammonio ed ha lasciato separare una sostanza fioccosa simile in tutto a quella che si aveva, nelle stesse condizioni, colla soluzione attiva. E' stata raccolta su di un filtro, lavata, sciolta nuovamente nell'acqua e dializzata. Il liquido dializzato è stato evaporato a secco ad una temperatura di 38° ed il residuo aveva tutto l'aspetto di quello della diastasi attiva, però non coagulava più il latte. Quindi l'albumosa presamica è rimasta colla sua proprietà fondamentale e non ha subìto una trasformazione profonda, una peptonizzazione vera od altro. Però si può sempre obbiettare che, trattandosi di mescolanze, l'albumosa separata, dopo decomposizione del presame, appartenga a quelle inattive, forse più resistenti e che rimangono tali anche per azioni più energiche, mentre quella presamica sia passata nelle acque da cui è stato separato il precipitato.

Se così fosse, in una soluzione presamica decomposta, immancabilmente il numero delle molecole dovrebbe essere maggiore che in quella indecomposta, mentre il detto numero subirebbe una variazione relativamente piccola, nel caso del distacco dei soli gruppi ammidici.

Difatti una soluzione di diastasi proveniente dalla decomposizione di un precipitato mercurico e contenente perciò acido fosforico ed acido cloridrico liberi, è stata divisa in due parti, una delle quali è stata riscaldata a 100° per 10 minuti, poi di ciascuna è stato determinato il punto di congelamento. Ho ottenuto il risultato seguente:

	Abbassamento della	
	Soluzione intatta	Soluzione riscaldata
1 cmc. coagula 100 di latte in 110 secondi . .	0°.07	1°.14

Ciò che dimostra realmente che l'albumosa presamica riscaldata prolungatamente in presenza di acidi minerali, si peptonizza e nella soluzione aumenta il numero delle molecole. Però questo è un esperimento, come si vede, esagerato e lungi dalle condizioni ordinarie.

Perciò in altra esperienza ho preso una soluzione di presame quale viene dalla infusione degli abomasi e quindi senza acidi minerali li-

beri. Ho diviso la soluzione in due parti, una delle quali ho riscaldata fin presso 100°, così da decomporre completamente la diastasi, poi in ambedue ho determinato il punto di congelamento ed ho ottenuto i risultati seguenti:

	Abbassamento della	
	Soluzione intatta	Soluzione riscaldata
1 cmc. coagula 100 di latte in 100 secondi . .	2°.30	2°.29

Di queste stesse due soluzioni ho determinato anche il potere conduttivo specifico ed ho ottenuto risultati in perfetta concordanza col punto di congelamento.

	Soluzione intatta	Soluzione riscaldata
Resistenza specifica a 18°	173.01	185.76
Conducibilità specifica a 18°	0.00636	0.00538

Vale a dire che non solo non si ha decomposizione profonda della molecola diastasica, quando essa perde la proprietà di coagulare il latte, ma che il numero delle molecole o degli joni aumenta di poco, perchè tale aumento è completamente compensato, ed anche ve ne è in abbondanza, dagli effetti prodotti dall'albumina che coagula e che si trova in piccola quantità nell'estratto degli abomasi.

Dunque la diastasi presamica non si decompone profondamente, allorchè perde il potere di coagulare il latte, ma subisce una modificazione non molto grande, che le fa perdere il carattere peculiare che la distingue dalle albumose ordinarie e che la distingue dall'albumosa stessa che si ha dopo la detta modificazione. E cade naturalmente l'ipotesi per la quale nel liquido diastasico dovrebbero esistere albumose più resistenti all'azione del calore di quella presamica.

***

Contuttociò, per meglio avvalorare la mia conclusione, ho tentato sulla diastasi l'azione di reattivi speciali del gruppo ammidico ed ho messo in relazione i loro effetti col potere coagulante. Così ho fatto agire l'acido nitroso in una soluzione di presame, proveniente dalla decomposizione di un precipitato mercurico, ed in una soluzione proveniente direttamente dalla infusione degli abomasi, alla quale aggiungevo alcune goccie di soluzione di acido fosforico; cioè ho sciolto in 50 cmc. della prima, gm. 0.5 in 50 cmc. della seconda, 3 gm. di

nitrito di potassio, il quale per azione dell'acido cloridrico contenuto nell'una e dell'acido fosforico contenuto nell'altra, si è decomposto in acido nitroso. Questo avrebbe potuto agire sui gruppi ammidici e dare dei composti, annullando il potere coagulante della diastasi, ammesso che questi siano i gruppi attivi.

Per moderare l'azione ossidante dell'acido nitroso, ho aggiunto sempre il nitrito alla soluzione diastasica raffreddata in ghiaccio e l'ho tenuta così raffreddata per tre giorni, e per il resto, alla temperatura dell'ambiente.

Ho ottenuto i risultati che raccolgo nella seguente tabella:

DATA	1 cmc. della soluzione coagula 100 di latte a 40°	Soluzione con gm. 0.5 di nitrito Minuti secondi	Soluzione con gm. 3 di nitrito Minuti secondi
28 maggio	All' inizio	137	260
	Dopo 6 ore	..	295
30 »	Dopo 2 giorni	164	286
31 »	Dopo 3 »	185	..
1 giugno	Dopo 4 »	255	580
2 »	Dopo 6 »	592	..

Dai quali apparisce evidente che l'acido nitroso non provoca la diazotazione dei gruppi ammidici, perchè, nell'affermativa, il potere coagulante avrebbe dovuto scomparire dopo un'azione relativamente breve di esso. E ciò era prevedibile, perchè se le diammine si diazotizzano con grande difficoltà e con metodi speciali (1), a più forte ragione doveva presentare la stessa difficoltà una poliammina, quale si deve supporre che sia il presame. Quindi la graduale perdita del potere coagulante che si osserva nelle esperienze sopra riferite, non dipende da altro che da una lenta ossidazione per la quale al gruppo ammidico si va sostituendo mano mano il gruppo ossidrilico. La stessa cosa difatti si ha con altri ossidanti, quali il permanganato di potassio, l'acqua ossigenata, ecc., come ebbi occasione di dimostrare nell'ultima mia nota.

Maggiore interesse, o più diretto, presenta l'azione della formaldeide sulla diastasi. Difatti, un presame secco, ottenuto per l'inter-

(1) Lassar-Cohn. *Arbeitsmethoden*..... 1903, p. 509.

mezzo del precipitato mercurico e di cui 5 centgr. coagulavano 100 cmc. di latte a 40° in 71 secondi, fu trattato direttamente con un po' di soluzione di formaldeide e lasciato così per una notte. Gran parte di esso, se non tutto, solubilissimo nell'acqua, com'era, si rese insolubile e la sospensione non coagulava più il latte.

In un'altra esperienza, ho fatto agire la formaldeide sulla soluzione diastasica e cioè 100 cmc. di soluzione sono stati divisi in due parti; ad una sono stati aggiunti 10 cmc. di soluzione di formaldeide, all'altra 10 cmc. di acqua distillata. Pochi minuti dopo è stato determinato in ognuna il potere coagulante ed ho ottenuto i risultati seguenti:

	Senza formaldeide	Con formaldeide
1 cmc. di soluzione diastasica coagula 50 cmc. di latte a 40' in secondi	530	non coagula

In un'altra esperienza ancora, 50 cmc. di un estratto presamico sono stati divisi in due parti: ad una sono stati aggiunti 5 cmc. di soluzione di formaldeide, all'altra 5 cmc. di acqua distillata. Poco dopo cotesta aggiunta, è stato determinato il potere coagulante ed ho ottenuto il risultato seguente:

	Senza formaldeide	Con formaldeide
1 cmc. di soluzione diastasica coagula 50 cmc. di latte a 40' in secondi	92	200
Il giorno seguente	90	non coagula

Finalmente, 50 cmc. di soluzione di diastasi sono stati divisi in due parti: ad una sono stati aggiunti 2 cmc. di formalina, all'altra 2 cmc. di acqua distillata ed un po' di cloroformio per impedire ogni alterazione. Ambedue sono state messe in luogo oscuro e di ciascuna è stato determinato, ogni giorno, il potere coagulante. Ho ottenuto il risultato che qui sotto trascrivo.

1 cmc. di soluzione diastasica coagulano 50 di latte a 40° in secondi	Senza formaldeide	Con formaldeide	Differenza
15 marzo	64	108	44
16 »	42	112	70
18 »	57	212	155
19 »	56	245	189
20 »	58	325	267
21 »	57	372	315
22 »	70	403	333
24 »	80	1080	1000

Dai quali risultati si apprende che la formaldeide agisce sul presame facendogli perdere il potere coagulante con tanto più celerità, quanto maggiore è la concentrazione di lei nella mescolanza. Perciò il presame secco si trasforma immediatamente in una sostanza inattiva, insolubile nell'acqua e simile a quella che si ottiene dalle albumine, per la stessa azione della formaldeide; mentre le soluzioni divengono inattive con tanto minore celerità quanto minore in esse è la quantità di fòrmaldeide.

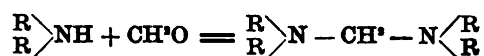
Questa azione a me sembra di non poterla spiegare altrimenti che per una sostituzione del gruppo metilenico, a due atomi di idrogeno del gruppo ammidico, oppure, a due atomi di idrogeno di gruppi ammidici vicini, perchè la formaldeide nell'istesso modo agisce, con maggiore o minore facilità, su molte sostanze contenenti il gruppo anzidetto. Ed, in questo caso, poichè i gruppi ammidici nella diastasi sarebbero i gruppi attivi, il potere coagulante si dovrà perdere subito e completamente nel caso che il metilene copra, in una volta, tutti i gruppi ammidici; si dovrà perdere gradualmente nel caso che ciò avvenga in un modo lento e graduale.

E che la formaldeide agisca sul gruppo ammidico, mi basterà ricordare le seguenti combinazioni colle ammine, diammine ed ammidi aromatiche.

Per azione sulle ammine grasse, si ottengono due composti a seconda che esse siano primarie o secondarie:



$$R - NH^2 + CH^2O = R - N = CH^2 + H^2O$$

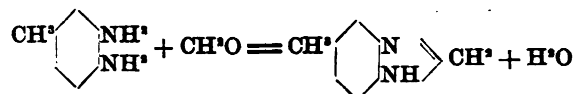


$$\genfrac{}{}{0pt}{}{R}{R}\!\!>NH + CH^2O = \genfrac{}{}{0pt}{}{R}{R}\!\!>N - CH^2 - N\!<\!\genfrac{}{}{0pt}{}{R}{R}$$

Per azione sull'anilina, si ottiene la anidroformaldeideanilina:



Per azione sulla toluilendiammina (1, 3, 4), si ottiene un imidazolo, la metilmeteniltoluilendiammina:

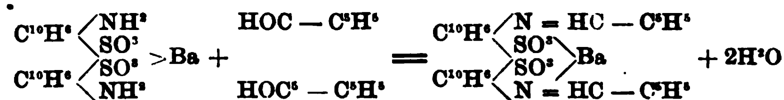


Per azione sull'urea si ottiene la metilenurea:



Per azione sugli acidi ammidati, si ha una elevazione dell'acidità. perchè si perde il carattere anfotero dal momento che il gruppo ammidico si è combinato col metilenico (1).

Del resto, l'azione delle aldeidi tanto grasse che aromatiche sul gruppo ammidico si può dire generale e caratteristica. Oltre ai noti composti della fenilidrazina, rammento quelli del naftionato di bario, insolubili nell'acqua, colle aldeidi superiori ed aromatiche, per i quali si può ottenere la depurazione di queste meglio ancora che col bisolfito di sodio. Cotesti composti si formano precisamente per il gruppo ammidico contenuto nell'acido naftionico, come apparisce dalla seguente reazione (2).



Perciò mi pare difficile di poter negare la esistenza di gruppi ammidici nella diastasi e conseguentemente di poter negare anche che questi siano i gruppi attivi. Perchè altrimenti non sapremmo più spiegare i fatti fino ad ora riferiti, compresi quelli delle note precedenti.

Dunque, la diastasi presamica è una vera base, che non può esistere allo stato libero, ma esiste allo stato di combinazione, coll'acido fosforico a preferenza.

---

(1) STEINEGGER. Revue du lait, 1906, p. 206.
(2) D. R. P. 124229. 1901. Arbeitsmet f. Organisch. Chem. Laborat. Lassar-Cohn. 1903, p. 793.

E che sia così lo possiamo dedurre dalla seguente esperienza.

Cmc. 100 di un estratto presamico sono stati divisi in due parti uguali; una è stata neutralizzata con soluzione di barite fino a presentare il liquido una leggerissima acidità, alle carte di tornasole, l'altra è stata lasciata così come era. Le due soluzioni sono state messe in due capsule di porcellana identiche ed a fondo piano e riscaldate per 7 ore in bagnomaria ad una temperatura non superiore a 40°. Furono poi portate al volume primitivo con acqua distillata, dopo fredde, ed esaminate, per rispetto al loro potere coagulante sullo stesso latte. Ho ottenuto i risultati che qui sotto riferisco:

	Estratto primitivo	Estratto riscaldato	Estratto neutralizzato e riscaldato
2 cmc. di estratto coagulano 100 cmc. di latte a 40° in secondi	189	38° 190	38° 510
2 cmc. di estratto coagulano 100 cmc. di latte a 40° in secondi	98	40° 107	40° non coagula in 10′

I quali risultati dimostrano che la diastasi, così come viene dagli abomasi, non si altera affatto o pochissimo per un riscaldamento anche prolungato ad una temperatura sotto 40° od a 40°, mentre si altera notevolmente o completamente quando l'acidità del liquido è stata neutralizzata in parte o tutta, servendo quale indicatore la carta di tornasole.

La spiegazione di questo fatto discende naturalmente da quanto è stato concluso or ora; perchè la base presame combinata ad un acido forma un sale che è un elettrolito e che perciò nell'acqua si trova allo stato dissociato. Col tornasole o colla fenolftaleina si neutralizza tutto l'anione dell'elettrolito, mettendo in libertà la base, decomponibilissima in tale stato, che non può essere sentita dagli indicatori suddetti, quali acidi debolissimi. E difatti l'estratto acquoso degli abomasi è acido alla carta di tornasole ed alla fenolftaleina, è neutro o non acido all'arancio di metile, il quale per gli acidi liberi o per lo jone idrogeno ha una grande sensibilità.

Difatti 50 cmc. di due estratti presamici, diversi per origine, sono stati decolorati con carbone animale e neutralizzati con potassa ed ho ottenuto i risultati seguenti:

Cmc. di KOH $N/_{10}$ Con fenolftaleina	Cmc. di KOH $N/_{10}$ Con arancio di metile	Potere coagulante in secondi 1 cmc. in 100 di latte a 40°
35	Non acido	68
38	Id.	60

La stessa cosa si ha col cloridrato di anilina, il quale è pure acido alle carte di tornasole ed alla fenolftaleina ed è neutro all'arancio di metile. Difatti ho sciolti 2 gm. di cloridrato puro e cristallizzato in 50 cmc. di acqua ed ho titolato la soluzione, con fenolftaleina indicatore, ottenendo i risultati seguenti:

Acido cloridrico calcolato in gm. 2...	gm. 0.5637	28.18 %
Id. trovato............	» 0.5657	28.28 »

I quali dimostrano che il cloridrato di anilina è un sale molto dissociato, così da poter titolare tutto l'anione in esso contenuto, precisamente come avviene per il presame.

Quindi, dalle esperienze citate, a me sembra che rafforzata riesca la conclusione alla quale giunsi nell'ultima mia nota; che, cioè, la diastasi presamica non sia altro che una base debole, costituita di un nucleo albuminoide e precisamente di quello delle albumose, con più gruppi ammidici laterali.

***

Con tale conoscenza, si può spiegare, per via chimica, l'azione del presame sulla caseina e la conseguente coagulazione?

La caseina, come appare dal comune consenso degli sperimentatori, è il sale alcalino od alcalino terroso di un acido polibasico debole (1), combinato al fosfato tricalcico nella forma di un fosfocaseinato. Cotesto complesso si trova nel latte allo stato colloidale ed in soluzione vera e la parte disciolta jonizzata ed in parte anche idrolizzata, l'acido libero restando sospeso come idrosol colloidale (2). A queste conclusioni, oltre alle determinazioni fisico-chimiche, tritimetriche e chimiche, conduce anche il fatto che la paracaseina scioglie il fosfato tricalcico, precipitato di recente, in presenza solo di acqua comune,

(1) Söldner, combinando, nel modo più razionale, gli acidi e le basi, contenute nel latte, trovava sempre un eccesso di calce che egli attribuiva alla caseina. Vedi anche *Revue du lait*, 1906, p. 367.
(2) *Biochemische Centralbl.*, vol. 4°, p. 333.

contenente sali di calcio, poichè è una speciale proprietà del caseinato e non della paracaseina di combinarsi al fosfato e di formare una specie di sale doppio.

Questo complesso si trova nel latte e si raccoglie sotto forma di morchia nelle centrifughe (1), depositata per azione combinata del calore, 30° C., che rende la combinazione meno solubile e della forza centrifuga che la separa, come fa, in generale, non solo dei corpi sospesi, di quelli anche disciolti con peso molecolare molto elevato (2). Questa morchia si ridiscioglie a freddo nell'acqua nelle identiche condizioni che si trovava nel latte.

D'altra parte, è accertato che il presame agisca esclusivamente sulla caseina, poichè sono state riconosciute erronee tutte le supposizioni per le quali la coagulazione avverrebbe per azione indiretta o secondaria (3). Però, in qual modo il presame esplichi la sua azione sulla caseina non è stata e non è cosa facile da dimostrare. Onde la supposizione che essa nel rapprendersi si decomponga in paracaseina ed in lattalbumina (Hammarsten); in paracaseina ed in caseinalbumosa (Arthus e Pagés) oppure in paracaseina ed in un corpo albuminoide ignoto (Laqueur e Rotondi). Ma in verità, cotesta supposizione non deve essere considerata che un tentativo, poichè non solo non vi è accordo tra gli sperimentatori sulla sostanza che si dovrebbe separare dalla caseina, ma essa è anche contraria alle esperienze di Duclaux (4), colle quali è stato dimostrato che tanto nel siero ottenuto per filtrazione del latte attraverso candela di porcellana, quanto in quello ottenuto per coagulazione con presame, si trova la stessa quantità di albumina. Anzi, usando, come hanno fatto Lindet ed Ammann (5), per la filtrazione del latte una lastra di caolino, nel siero, così ottenuto, vi ha più albumina che in quello ottenuto con presame. Oltreacciò, la differenza che si vorrebbe riscontrare tra caseina e paracaseina, cioè tra la caseina del latte e la paracaseina del coagulo è molto incerta, poichè fondata sulla maggiore o minore celerità colla quale le due sostanze precipitano coi sali dei metalli alcalino-terrosi. Ma questa differenza può esser meglio messa in relazione collo stato diverso in cui si trovano la caseina e la paracaseina, piuttostochè con un cambiamento profondo della molecola. Perchè colla

(1) Revue du lait, 1906, p. 361.
(2) Lobry de Brun e Van Calcar. Rev. Trav. chim. des Pays-Bas, vol. 23, p. 218.
(3) Biochem. Centralbl., vol. 4°, p. 334.
(4) Ann. de l'Instit. agron., 1883, p. 77
(5) Revue du lait, 1906, p. 369.

paracaseina, non solo si può ricostituire la caseina quale si trova nel latte, colle stesse proprietà, ma anche ottenere gli stessi lattati (1). Quindi, è più probabile che il presame, invece di decomporre la caseina, apporti in essa una modificazione non grande, la quale dovrebbe consistere nella decomposizione del sale dell'acido caseinico e nella conseguente liberazione dell'acido insolubile, che formerebbe il coagulo. Ma come si arriva a ciò per azione del presame?

La diastasi e la caseina, come abbiamo visto, si trovano nell'acqua allo stato dissociato e perciò possiamo supporre che gli ioni, reagendo, diano il fenomeno, tanto discusso, della coagulazione. Cioè, il catione del presame si unirebbe all'anione della caseina e l'anione fosforico del presame si unirebbe al catione alcali o terre della caseina. E questo scambio deve avvenire perchè il fosfato alcalino od alcalino-terroso è certamente meno dissociato della combinazione caseina-presame, formata, come è, di un acido e di una base debolissimi. Però questa combinazione, molto dissociata, facilmente si idrolizza e si scinde in acido caseinico, pochissimo o affatto dissociato e nella base presame, la quale si deve certo ricombinare all'anione fosforico di sali più dissociati in soluzione, dando a questi una orientazione diversa. E che sia così lo deduciamo dai fatti che il latte di vacche a gravidanza inoltrata coagula molto male o non coagula affatto col presame, perchè, si dice, si è impoverito di fosfati, i quali servono alla costituzione del feto e che pure coagula male o non coagula affatto il latte ottenuto da vacche alimentate con erbe poverissime di alcali e di acido fosforico (2). Ciò può esser anche messo in relazione colle osservazioni di Bierry, Gioja Henri (3) e Preti (4) per le quali la diastasi amilolitica del pancreas perde il potere di agire sull'amido privata dei sali per dialisi, ma lo riacquista per aggiunta di un sale, di un acido o di un misto di acidi o di un misto di sali quale si trova nell'acqua del mare. Queste osservazioni appoggiano fortemente la supposizione che i fosfati del latte forniscano l'anione per salificare nuovamente la base presame e proseguire nella sua azione coagulante. Però, per conseguire la nuova orientazione dei sali in soluzione nel latte si richiede un certo lavoro, che ritarda la coagulazione: ritardo che può essere risparmiato, nel caso che sia presente un acido libero in piccola quantità, poichè gli acidi liberi, come si sa, favoriscono ed accelerano la coagulazione, fornendo l'anione.

---

(1) Laxa. Milchwirtschapliches Zentralbl., vol. 1°, 1905.
(2) Orla Jensen Revue du lait, 1906, p. 103, 121, 152, 178 e 198.
(3) Compt. rend. de la Soc. de Bi·log., 1906.
(4) Biochemische Zeitschrift, vol. 4°, 1907, p. 1.

Il presame rigenerato, a contatto di nuova caseina, produce la stessa reazione, di cui è stato parlato or ora e così fino alla completa trasformazione di essa in acido caseinico, od alla coagulazione completa del latte.

In questo modo si spiega l'azione graduale della diastasi sul latte, quale si rileva dalla viscosità che cresce dall'aggiunta del presame alla coagulazione; si spiega la sproporzione tra quantità di diastasi e caseina trasformata e si spiega la presenza del presame nel siero, dopo la coagulazione. E credo che si possa spiegare l'azione acceleratrice o ritardante di certi sali, di cui gli ioni o favoriscono o ritardano la formazione dei composti sopradetti o la loro decomposizione. Però questa parte ha bisogno di uno studio accurato sul quale mi riservo di tornare in avvenire.

Immunità naturale ed ereditaria. — E' noto come nelle infezioni da protozoi, molto più che nelle infezioni batteriche, la recettività delle varie specie animali ad uno stesso agente patogeno, sia strettamente limitata: così tutte le specie animali, tranne l'uomo, sono assolutamente refrattarie alla malaria umana, così il *Trypanosoma Lewisi* si moltiplica soltanto nei ratti, e il *Tryp. Theileri* nel bue; così le singole piroplasmosi sono tutte specifiche per una data e sola specie animale. Fanno eccezione a questa regola molte tripanosomiasi delle quali possono ammalare spontaneamente ed essere sperimentalmente infettati i più diversi mammiferi: un'altra eccezione sarebbe data, ove il fatto fosse confermato, dalla « Tiermalaria », descritta da Ziemann a Kamerun: l'autore avrebbe potuto trasmettere la malattia dall'asino al gatto, ed emette l'ipotesi che questa malaria degli animali possa avere degli stretti rapporti anche con la malaria dell'uomo (1).

Se però le singole infezioni protozoarie sono per lo più strettamente legate a una sola specie animale, è tutt'altro che dimostrata invece, la immunità naturale di alcuni individui della specie recettiva all'infezione. Sembra ormai accertato che per la malaria, per le tripanosomiasi, per le piroplasmosi, si debba ammettere in qualche individuo una maggiore resistenza all'agente infettivo; maggiore resistenza che si manifesta con un decorso più mite della malattia; *ma non una assoluta immunità naturale*. E vedremo in seguito come altra sia la spiegazione da darsi alla così detta immunità dei negri alla malaria umana, e a quella dei bovini nati in contrade dove è endemica la piroplasmosi.

La maggior parte degli autori è concorde nell'ammettere che le malattie causate da protozoi non si trasmettano ereditariamente: vi sono, d'altra parte, numerose osservazioni le quali dimostrano come individui nati da un animale che aveva in atto una infezione protozoaria non possiedono in alcun modo una *immunità congenita* per quella data infezione; così per la malaria (Schaudinn ha osservato due casi di infezione primitiva in bambini di pochi mesi, nati da madre malarica), così per le tripanosomiasi: ed io stesso ho avuto l'opportunità di inoculare con successo delle cavie e dei ratti con gli stessi tripanosomi dei quali era infetta la madre durante la gestazione.

Per alcune infezioni è stato dimostrato che non vi è assolutamente una *immunità ereditaria:* così Lavéran e Mesnil hanno potuto infet-

---

(1) La *spotted fever* delle Montagne Rocciose sarebbe una piroplasmosi che dall'uomo si potrebbe trasmettere sperimentalmente agli animali da laboratorio. Il fatto, però, merita conferma.

tare col *Trypanosoma Lewisi* alcuni ratti nati da una madre che possedeva, rispetto allo stesso tripanosoma, l'immunità conferitagli dall'infezione già superata. Per altre malattie da protozoi vi sono osservazioni che dimostrerebbero l'esistenza di una immunità ereditaria, ma di breve durata e poco intensa; così nella piroplasmosi del cane (Kleine) e nella febbre della Rodesia (Koch).

Immunità consecutiva alla infezione sofferta. — Vi sono alcune infezioni da protozoi che lasciano nell'animale che le ha superate una immunità durevole. E' questo il caso della infezione da *Trypanosoma Lewisi*.

I ratti, infettati naturalmente o sperimentalmente con questo protozoo, dopo alcune settimane non contengono più nel loro corpo alcun tripanosoma: il loro sangue e gli organi non sono capaci, inoculati in un ratto nuovo, di trasmettere la malattia; e d'altra parte non è più possibile di infettare una seconda volta un ratto che abbia già superato l'infezioue.

Nel maggior numero delle altre malattie protozoarie, invece, non si può dimostrare in modo così netto lo stabilirsi di una immunità acquisita. Nella malaria umana, p. es., molti mesi dopo che l'infezione sembra spenta si può presentare una recidiva la quale dimostra come alcuni parassiti avessero persistito nell'organismo affetto: nè d'altra parte è escluso in modo assoluto che un individuo guarito dalla infezione malarica non possa dopo alcuni anni essere nuovamente colpito da una infezione primitiva. E' certo però che molti dati epidemiologici parlano in favore di quella che si chiama immunità acquisita in seguito alla malattia sofferta e spontaneamente guarita: ed è appunto in questo fatto che Koch e molti altri scienziati hanno trovato la spiegazione della poca recettività alla malaria nei negri indigeni di località malariche: si tratta per la maggior parte di individui che sono stati malarici durante i primi anni di vita e che sembrano aver così acquistato una immunità all'infezione.

Lo stesso fatto si può osservare nelle piroplasmosi degli animali: e così pure sperimentalmente si può riprodurre negli animali con i vari tripanosomi: è noto come Lavéran e Mesnil si sono giovati appunto della refrattarietà dimostrata da un animale che abbia superato una infezione da tripanosomi verso lo stesso virus, per stabilire la diversità fra tripanosomi di varia provenienza.

Si può parlare però in questi casi di una vera immunità? Io non lo credo. Mancano sempre dei dati abbastanza sicuri per dimostrare che la malattia è stata superata e l'agente di essa è del tutto scomparso dall'organismo che ne fu colpito. Anzi, in moltissimi casi, sia

nelle piroplasmosi (1), sia nelle tripanosiomiasi, si è potuto accertare la presenza del virus nel sangue o negli organi di un animale che da molti mesi e da molti anni (Lounsbury, Schröder, Koch) sembrava guarito; e spesso accade che una infezione di altra natura riveli nel sangue di questi animali i pirosomi che gli esami precedenti non avevano dimostrato (Marchoux; Memmo, Martoglio e Adami). Ed è perciò che mi sembra giustificato il sospetto che nel maggior numero dei casi a torto si parli di immunità acquisita nelle infezioni da protozoi: mentre si dovrebbe parlare piuttosto di persistenza della malattia (2), non più diagnosticabile con l'indagine clinica, nè, per lo più, con la ricerca microscopica: ma che potrebbero mettere in evidenza soltanto le ripetute inoculazioni in animali recettivi.

Vaccinazioni. — Date queste restrizioni che è d'uopo fare sulla esistenza di una vera immunità acquisita, almeno nella maggior parte delle malattie protozoarie: e dato anche il fatto che non si conoscono mezzi sicuri per attenuare i virus, e che non hanno dato buoni risultati i tentativi per immunizzare gli animali con sostanze provenienti da individui malati prive o private dei germi vivi (siero di animale infetto filtrato, Lingard, bile di animali morti di Surra, Edington, ecc.) si vedono già *a priori* le incertezze, gli inconvenienti, i pericoli delle vaccinazioni. I metodi di vaccinazione proposti per le tripanosomiasi da Koch, da Schilling, da Martini, da Lignières, da Diesing e da molti altri sono stati in gran parte trovati insufficienti o cattivi da altri sperimentatori: così Nocard e Lavéran e Mesnil non hanno potuto confermare i risultati di Schilling. E fino a un certo punto lo stesso si può dire delle vaccinazioni contro le piroplasmosi (Lignières, Koch, ecc.).

L'inconveniente maggiore, comune a tutti questi metodi di vaccinazione, consiste nel fatto che è necessario produrre negli animali che si vogliono vaccinare una vera malattia, di cui la benignità è per lo più in rapporto non già con la provenienza del virus, ma con le condizioni di maggiore resistenza degli animali vaccinati; ci si rende perciò facilmente ragione della causa di tutti gli insuccessi: i quali

---

(1) Secondo Theiler e Stockmann nella piroplasmosi della Rodesia, data dal *Pirosoma parvum*, gli animali guariti e gli immunizzati non avrebbero più il virus: si tratterebbe in questo caso di una vera e propria immunità acquisita.

(2) Confronta coll'immunità locale che presentano gli animali malati di durina (Nocard) e con quanto Levaditi dice a proposito della immunità cutanea nell'infezione sifilitica: « l'organismo resiste ad una infezione successiva non perchè è vaccinato e guarito dalla malattia, ma perchè è ancora portatore del virus della sifilide ».

sono dovuti al fatto che durante l'immunizzazione può darsi che si perda il maggior numero degli animali trattati. Ciò vale principalmente per le infezioni da tripanosomi, per le quali ci sono assolutamente sconosciute le cause che permettono agli individui di offrire una maggiore resistenza all'agente patogeno.

Siero-profilassi. — E' stata tentata da Celli e Santori la siero-profilassi della malaria umana con siero di animali immuni, con siero di animali che avevano superato uno o più attacchi di piroplasmosi, con siero di animali trattati con materiale malarico umano. Queste ricerche hanno dato risultati negativi o incerti, ed ora l'esito universalmente riconosciuto della profilassi chimica, rende inutile ritentare la via incerta della sieroprofilassi.

Fra le tripanosomiasi esercita un'azione specifica preventiva sicura il siero di ratti che abbiano superato l'infezione da *Tryp. Lewisi* (Rabinowitsch e Kempnar, Lavéran e Mesnil, Francis): per altre tripanosomiasi avrebbero avuto buoni risultati Diesing e Kleine e Moeller, nel Nagana, col siero di asini iperimmunizzati, Rouget nella Durina col sangue di conigli malati, Thiroux nella infezione da *Tryp. gambiense* con il siero di individui affetti da malattia del sonno.

Da molti altri autori però queste osservazioni non sono state confermate, e ancora dobbiamo considerare aperto il problema della siero-profilassi nel maggior numero delle infezioni causate da tripanosomi patogeni.

Migliori risultati ha dato la siero-profilassi in alcune piroplasmosi. Koch avrebbe trovato che il siero di bovini immunizzati contro la febbre Rodesiana è dotato di notevole potere preventivo: tale osservazione non è stata però confermata da Gray; nè a Dschunkowsky e Luhs riuscì di ottenere un siero attivo. Invece una azione preventiva certamente efficace fu dimostrata da Nocard e Motas (e l'osservazione è stata confermata da Theiler) nel siero di cani che abbiano superato un attacco di piroplasmosi e siano successivamente trattati con forti dosi di sangue virulento. Gli stessi autori avrebbero ottenuto un siero debolmente preventivo per la piroplasmosi del cane, anche inoculando a una pecora sangue contenente abbondanti parassiti della piroplasmosi canina.

Sieroterapia. — Ha dato per ora scarsi risultati: è attivo in molte tripanosomiasi degli animali il siero umano (Lavéran e Mesnil); lo sarebbe nella infezione da *Tryp. Evansi* (Surra) il siero di capra (Rost), talora nel Mal de Caderas il siero di animali morti durante la immunizzazione col *Trip. equinum* (Lavéran e Mesnil).

Il siero di Nocard e Motas, che ha forte potere preventivo, eser-

cita nella piroplasmosi del cane anche una azione curativa, somministrato non più tardi di 42 ore dopo l'inoculazione del virus.

Anticorpi negli animali refrattari e negli animali infettati. — Nelle infezioni ed intossicazioni batteriche il trattamento preventivo e curativo col siero di animali immunizzati è legato alla presenza in esso di anticorpi specifici. Nelle malattie da protozoi molte sono a questo proposito le osservazioni, ma non tutte sicuramente accertate.

Agglutinine specifiche si trovano negli animali guariti dall'infezione con *Tryp. Lewisi* (Lavéran e Mesnil, Jürgens), e vi sarebbero, secondo Lavéran e Mesnil, anche in altre infezioni da tripanosomi: Brumpt e Wurtz avrebbero osservato un'agglutinazione, fino a un certo punto specifica, per il *Tryp. gambiense* nel siero di un individuo affetto dalla malattia del sonno.

Precipitine specifiche sarebbero contenute nel siero di cani infettati con *Tryp. Brucei* (Mayer).

Schilling e Martini osservarono nel sangue di animali immunizzati col tripanosoma di Togo la presenza di *sostanze parassiticide:* in una mia precedente memoria io supposi che in alcuni stadi della malattia vi fossero nel siero degli animali infettati con i vari tripanosomi delle sostanze tripanolitiche: e Rodet e Vallet osservarono nel Nagana una tripanolisi extracellulare nella milza e nel sangue. Il siero umano normale e il siero del cinocefalo è fornito (Lavéran) di notevole potere parassiticida verso quasi tutti i tripanosomi patogeni dei mammiferi: lo stesso potere eserciterebbe sul *Tryp. Evansi* il siero di capra (Rost), sul *Tryp. equiperdum* il siero umano e il siero di ratti guariti da una infezione di *Tryp. Lewisi* (?) (Rabinowitsch e Kempner), sul *Tryp. paddae* il siero di ratto (Sevin).

Il siero di cane immunizzato con il *Pirosoma canis* e il siero di pecora trattato con sangue di cane infetto ha azione parassiticida specifica sull'agente etiologico della piroplasmosi canina (Nocard e Motas).

***

Riferirò brevemente alcune *esperienze da me fatte per ricercare nel siero la presenza di antisostanze verso i tripanosomi.*

Nella prima serie di esperienze mi sono giovato della iperimmunizzazione di animali che normalmente sono refrattari ai tripanosomi dei mammiferi,

Lavéran e Mesnil tentarono, con esito negativo, di trattare animali infettati con il *Tryp. Brucei*, col siero di oche e di polli ai quali avevano precedentemente iniettato a varie riprese sangue con-

tenente abbondanti tripanosomi. Esperimenti simili furono fatti da Rouget per il *Tryp. equiperdum.* Il pollo, come tutti gli uccelli, è refrattario in genere alla tripanosomiasi dei mammiferi: solo eccezionalmente Mesnil e Martin hanno riscontrato nel sangue di un'oca inoculata col Nagana alcuni tripanosomi: e Goebel ha osservato lo stesso fatto nel pollo: in tutti e due i casi però gli animali non dimostrarono alcun sintoma morboso; e si può chiedersi se effettivamente i tripanosomi inoculati si siano moltiplicati nel corpo dell'oca o del pollo.

Io ho preparato due piccioni con sangue defibrinato di cavia ricco di *Tryp. equinum*, ed un piccione con sangue defibrinato di cavia contenente in gran numero il *Tryp. gambiense.* Le inoculazioni di sangue con tripanosomi (ogni volta 3-5 cm.^{3}) furono quattro, endomuscolari, distanziate fra loro di 8-10 giorni: durante la preparazione varie volte si è praticato l'esame microscopico del sangue dei tre piccioni, senza mai riscontrarvi alcuna forma di tripanosoma. Otto giorni dopo l'ultima iniezione si è prelevato il sangue dalla vena ascellare dei tre piccioni e se ne è raccolto il siero.

Il siero proveniente dai due primi piccioni è stato:

1° inoculato endoperitonealmente nella dose di 0.20 cmc. a topi grigi, dei quali alcuni hanno ricevuto dopo 24 ore una inoculazione di sangue con *Trypanosoma equinum*, altri di sangue con *Trypanosoma Brucei*, altri con *Trypanosoma gambiense;*

2° mescolato *in vitro* e lasciato a contatto per 2 ore alla temperatura di 37° C. con i tre stipiti di tripanosomi; ed i miscugli sono stati poi inoculati nel peritoneo di topi grigi;

3° inoculato nella dose di 0.20 cmc. nel peritoneo di topi grigi che 24 ore prima avevano ricevuto una inoculazione endoperitoneale di *Trypanosoma equinum*, o *Brucei*, o *gambiense.*

In modo analogo si è proceduto col siero ottenuto dal terzo piccione (preparato col *Trypanosoma gambiense*) ed un'altra serie di topi grigi finalmente è stata trattata in modo simile. sostituendo al siero di piccioni trattati, siero di piccione normale.

L'esito di queste esperienze è stato completamente negativo: tutti i topi sono morti, con reperto parassitario positivo, nello stesso tempo circa dei topi di controllo inoculati contemporaneamente con i soli tripanosomi.

Si può perciò concludere che *il siero dei piccioni trattati con tripanosomi dei mammiferi, ai quali essi sono refrattari, non ha alcuna azione preventiva nè curativa, nè alcun potere tripanolitico in vitro, verso i tripanosomi con cui fu preparato l'animale dal quale il siero proviene, o verso altre specie di tripanosomi: e che nessuna azione esercita il siero di piccioni normali.*

***

Nella seconda serie di esperienze ho ricercato *se col metodo della fissazione del complemento di Bordet e Gengou fosse possibile dimostrare la presenza di antisostanze specifiche nel siero di animali malati di tripanosomiasi*.

Il fenomeno indicato da Bordet e Gengou fin dal 1901, ha assunto in questi ultimi tempi nuova importanza, dopo che gli studi di molti autori da una parte ne hanno dimostrato il valore pratico per ricerche di medicina legale (Uhlenhuth, Neisser e Sachs, Schütze), dall'altra hanno applicato il metodo della deviazione del complemento in molte malattie infettive; e mettendo in evidenza proprietà specifiche del siero degli individui malati, di queste si sono giovati o a scopo diagnostico o per lo studio dell'agente etiologico (tubercolosi, Wassermann e Bruck, Gengou; sifilide e lesioni parasifilitiche, Wassermann, Neisser, Bruck, Schucht, Detre, Bab, Schütze, Levaditi e Marie, Morgenroth e Stertz; gonococco, Müller e Oppenheim, Bruck, Vannot; lepra, Eitner; tosse convulsa, Bordet e Gengou; rabbia, Bertarelli).

Il metodo della fissazione dell'alessina non è mai stato applicato per la ricerca di sostanze specifiche nelle infezioni protozoarie.

Fin dal dicembre dello scorso anno ho incominciato delle esperienze in questo senso per accertarmi se il siero di animali infetti di *Trypanosoma equinum* e di *Trypanosoma Brucei*, prelevato quando i tripanosomi scompaiono dal sangue (nel momento cioè in cui secondo la mia supposizione e l'opinione di Rodet e Vallet le sostanze tripanolitiche dovrebbero trovarsi in maggior copia), messo a contatto con i rispettivi tripanosomi fosse capace di dare il fenomeno di Bordet e Gengou.

Ecco alcuni dettagli sulla tecnica da me seguita in queste ricerche.

Il siero è stato prelevato da due cani infettati con *Trypanosoma equinum* e da un coniglio infettato con *Trypanosoma Brucei*. Nei tubi di controllo era siero di cane e siero di coniglio normali. Il siero riscaldato per mezz'ora a 56° C., nella quantità di 0.50 cmc., è stato messo a contatto con 0.50 cmc. di soluzione di cloruro sodico (0.85 %), nella quale erano stati emulsionati rispettivamente il *Trypanosoma equinum* e il *Trypanosoma Brucei*, raccolti dalla parte più superficiale del sedimento ottenuto per centrifugazione di sangue di cavia ricco di parassiti, e quindi lavati.

Al miscuglio di siero + emulsione di tripanosomi si è aggiunto 0.02 di siero fresco di coniglio normale per ogni cmc. e le provette così allestite sono state lasciate a 37° C. per 5 ore. Trascorso tale spazio di tempo le provette furono centrifugate e da ognuna si è decantato mezzo cmc., che

è stato portato in altre provette contenenti 0.05 di emazie di cavia sensibilizzate con siero di coniglio emolitico per la cavia (attivo nel rapporto di 1.20) emulsionate in 0.50 cmc. di soluzione fisiologica di cloruro sodico. In queste provette si osservava il risultato dopo un'ora di permanenza a 37° C.

Il fenomeno di Bordet e Gengou è stato negativo in tutte le prove, si è cioè avuta emolisi netta e completa in tutte le provette.

L'esito negativo del fenomeno di Bordet e Gengou può non avere molta importanza. Si tratta di una reazione così delicata e nella quale entrano in giuoco fattori tanto complessi che è facile immaginare come la preparazione dell'antigene, il momento di prelevare il siero in cui si ricercano le sostanze fissatrici della alessina, la scelta del siero emolitico per sensibilizzare le emazie, la scelta finalmente del complemento, possono avere la massima influenza nel determinare o nell'ostacolare la buona riuscita dell'esperimento. D'altra parte gli studi più recenti tendono a dimostrare che l'esito positivo della prova di Bordet e Gengou non è in diretto rapporto col contenuto in anticorpi specifici del siero sottoposto all'esame; così Neufeld e Hüne hanno studiato dei sieri antitifosi fortemente batteriolitici, eppure incapaci di fissare l'alessina; e sieri coi quali il fenomeno di Bordet e Gengou era positivo e che ciò non ostante erano sprovvisti di potere batteriolitico; e Levaditi e Marie hanno fatto una simile constatazione col liquido cefalo-rachidiano di individui affetti da paralisi generale.

Malgrado queste restrizioni credo tuttavia importante di continuare la applicazione del fenomeno di Bordet e Gengou nelle malattie da protozoi: e mi propongo di ripetere ed estendere tali ricerche nelle tripanosomiasi e nelle piroplasmosi.

***

Con il siero dei cani e del coniglio di cui mi sono giovato per saggiare il potere di fissare il complemento, ho istituito anche delle ricerche *in vivo* su topi grigi, ripetendo le stesse prove che già ho accennato a proposito del siero dei piccioni trattati con tripanosomi di mammiferi.

Anche in questo caso le prove sono state negative: ed il siero che non aveva dato la reazione di Bordet e Gengou, si è mostrato sprovvisto di ogni potere preventivo e curativo, nè ha manifestato alcuna azione tripanolitica sui tripanosomi della stessa o di altre specie.

***

Le ricerche fatte sin'ora per la vaccinazione e per il trattamento sieroterapico delle malattie da protozoi: e le mie ricerche personali sopra riferite sono poco incoraggianti a continuare sulla stessa via per combattere preventivamente e curativamente quelle infezioni.

I risultati ottenuti invece con altri mezzi in una malattia protozoaria dell'uomo, nella malaria, e quelli che via via più lusinghieri si vanno ottenendo nelle tripanosomiasi, ci fanno sperare che la vittoria della lotta contro le malattie protozoarie si possa conseguire con un adatto *trattamento profilattico e curativo con sostanze chimiche*.

Per la malaria dell'uomo si possiede nella chinina un rimedio quasi universalmente tollerato benissimo e per lungo tempo, e di efficacia non dubbia sia come mezzo profilattico, sia come mezzo curativo.

Nelle tripanosomiasi (1) si è tentata la somministrazione a scopo terapeutico delle più svariate sostanze medicamentose: dotate alcune di potere microbicida *in vitro*, sprovviste altre di ogni azione diretta sui parassiti: e sia tra le une, sia tra le altre, alcune si sono dimostrate abbastanza attive nella cura delle infezioni da tripanosomi. Dimostrata l'inefficacia dei sali di chinino, del sublimato, dell'acido fenico, e di molte e molte altre sostanze, tengono tuttora il campo due serie di rimedi. Da un lato l'acido arsenioso ed in genere molti preparati arsenicali, dall'altro un gran numero di sostanze coloranti.

L'arsenico ed i suoi derivati, introdotti per la prima volta nella cura delle tripanosomiasi da Lingard, furono sperimentati con vario successo, fra gli altri, da Lavéran e Mesnil, Chichester, Moore, Brumpt e Wurtz, Massaglia, de Magalhaes, ecc. Un progresso notevole, specialmente per ciò che si riferisce alla tripanosomiasi umana, segnò l'introduzione nella terapia dell'« atoxyl » (anilide metarsenica) per opera del Thomas: ed i tentativi, già numerosi, di cura della malattia del sonno con questa sostanza (Broden e Rodhain, Koch, Todd, Breinl e Todd, Uhlenhut Gross e Bickel, Mesnil Nicolle e Aubert, Martin, Gray e Tulloch, ecc.) sembrano essere stati coronati da buon successo.

La *cromoterapia* delle tripanosomiasi fu iniziata da Ehrlich con il « Trypanroth » ed i risultati di Ehrlich furono ben presto confer-

(1) Vanno ricordati i tentativi per curare la tripanosomiasi con prodotti batterici (NISSLE) e le applicazioni radioterapiche (DE NOBELE e GOEBEL) e fototerapiche (BUSCK e v. TAPPEINER).

mati da Lavéran, poi da Halberstaedter e da numerosi altri autori. Fra le molte sostanze coloranti adoperate, alcune non corrisposero all'aspettativa, come la crisoidina (Neave), altre diedero agli sperimentatori che ne tentarono la applicazione buoni risultati, ma non confermati da altri autori: così tra i derivati del trifenilmetano molti colori studiati da Krause e Weber: ed il verde melachite e il « Brillantgrün » sperimentati da Wendelstadt e Fellmer. Nicolle e Mesnil, da un accurato studio sistematico sulle varie sostanze coloranti, sono venuti alla conclusione che specialmente attivi sono alcuni derivati della benzidina (e fra questi è appunto il « Trypanroth »): e la configurazione del nucleo benzidinico, il numero, la posizione e la costistuzione delle catene laterali sono in rapporto con la maggiore o minore attività delle sostanze coloranti che risultano da questi complessi aggruppamenti atomici: come pure l'attività di alcuni derivati dell'arsenico, e specialmente dell' « atoxyl », sarebbe spiegata dalla posizione che l'arsenico occupa nella molecola. In base a questi dati Nicolle e Mesnil fecero preparare alcune sostanze coloranti che avessero *fattori morfologici* tali da dover esplicare la massima attività terapeutica. Infatti con due colori che chiamarono *Cl* l'uno e *Ph* l'altro, e con il « Trypanroth », gli autori ebbero i migliori risultati nella cura delle infezioni sperimentali da tripanosomi.

Nelle piroplasmosi le più svariate sostanze medicamentose furono volta a volta saggiate dagli scienziati e dai pratici, e più da questi che da quelli: chinino, derivati dell'arsenico, sali di mercurio (Baroni) sono fra le sostanze più usate.

***

Ho voluto tentare in una infezione da pirosomi l'azione di alcune sostanze medicamentose che hanno ben corrisposto nelle tripanosomiasi. Le mie osservazioni sono ben lungi dal portare una definitiva risposta alla questione tanto importante della cura della piroplasmosi: cura che da quanto ho detto più sopra credo deve farsi prevalentemente con sostanze chimiche: ma queste osservazioni rappresentano l'inizio di una serie di tentativi diretti ad escludere dalla terapia molte sostanze che si sono mostrate inefficaci, e a ricercare quella sostanza o quel gruppo di sostanze che si mostrino specifiche contro la malattia, così come il chinino lo è per la malaria e l' « atoxyl » sembra esserlo (Koch) per la malattia del sonno.

Le mie ricerche furono fatte nella piroplasmosi del cane. Il virus, proveniente dall' « Institut für Schiffs- und Tropenkrankheiten » di Amburgo, è stato conservato da circa 18 mesi mercè successivi passaggi

nei cani, e la sua virulenza si è mantenuta assolutamente inalterata, subordinata soltanto all'età e alla razza del cane infettato.

Per avere dei dati comparabili occorre in tutte le esperienze, scegliere cani molto giovani e di razza piuttosto fina: soltanto in questo caso si ha costantemente lo sviluppo uniforme e l'uguale decorso dalla malattia. I parassiti si presentano nel sangue quattro o cinque giorni dopo l'inoculazione endoperitoneale di un sangue contenente parassiti: 24-72 ore dopo lo scoppio della malattia i cani soccombono con i sintomi clinici e col quadro anatomo patologico caratteristici. Se si sperimenta invece su cani adulti o vecchi, i pirosomi compaiono del pari in circolo quasi sempre nel quinto giorno dopo la inoculazione: ma accanto ad alcuni animali che soccombono nel secondo o terzo giorno di malattia, ve ne sono altri nei quali, o per condizioni derivanti dalla razza, o per ragioni che sfuggono a ogni indagine, la infezione assume un andamento subacuto o cronico, ed i cani, pur mantenendo nel sangue il virus, clinicamente appaiono sani, e l'esame microscopico per lo più non svela la presenza degli scarsissimi parassiti. Date queste condizioni sarebbe difficile farsi un concetto sicuro dell'efficacia di sostanze somministrate a scopo terapeutico: ed è perciò che, pur sapendo di pormi in condizioni sperimentali molto sfavorevoli, ho sempre trattato cani giovanissimi. Poichè però in questi, dopo la comparsa dei parassiti, la malattia ha un decorso troppo rapido, perchè si possa sperare di arrestare l'infezione, ho creduto spesso opportuno incominciare il trattamento 48 ore dopo l'iniezione del virus: questa è sempre stata intraperitoneale, le sostanze somministrate a scopo terapeutico furono invece inoculate nel sottocutaneo o nei muscoli.

***

Gli animali trattati con le sostanze coloranti, presentano spesso nei giorni successivi alle iniezioni, una spiccatissima leucocitosi. Poichè sembra accertato che la reazione dell'organismo infetto alle malattie protozoarie sia prevalentemente una reazione fagocitaria; e poichè d'altra parte Memmo, Martoglio e Adami (1) hanno veduto guarire

(1) Con la collaborazione del dott. Memmo, ho istituito alcune esperienze trattando con olio essenziale di trementina alcuni cani sperimentalmente infettati con *Trypanosoma Brucei*. I cani trattati furono 5 ed in essi si determinò a varie riprese la formazione di ascessi chimici, mercè iniezioni di olio essenziale di trementina, in vari periodi della malattia. Il decorso e l'esito della infezione, e gli esami sistematici del sangue paragonati con l'esame di due cani di controllo ci hanno persuaso che *la formazione di ascessi chimici o la leucocitosi che li accompagna, non solo non esercita alcuna influenza sull'andamento generale della malattia, ma neppure determina azione alcuna sulle oscillazioni del reperto parassitario nel sangue.*

la piroplasmosi dei cani di Cassala determinando in essi la formazione di ascessi con la iniezione sottocutanea di olio essenziale di trementina: era interessante ricercare se, determinando nei cani infettati con pirosoma una forte leucocitosi, si potesse in qualche modo modificare il decorso della malattia.

Ho praticato perciò in tre cani, precedentemente inoculati nel peritoneo con *Pirosoma canis*, due o tre iniezioni sottocutanee di ½ cmc. di olio essenziale di trementina, incominciando il trattamento tre o quattro giorni dopo il momento della infezione sperimentale.

Ad altri due cani ho iniettato nella cavità peritoneale i pirosomi e dopo tre o quattro giorni 3 cmc. di una soluzione al 3 % di nucleinato sodico.

I 5 cani così trattati hanno presentato, 12-24 ore dopo la iniezione di trementina o di nucleinato sodico, manifesto aumento dei leucociti (12,000-15,000 per mmc.; media normale dei leucociti nel cane 6.000 per mmc.), eppure in tutti la infezione è progredita con decorso regolare: i parassiti sono comparsi nel sangue dopo il consueto periodo di incubazione, e gli animali sono morti da 5 a 8 giorni dopo la iniezione del virus.

Devo perciò concludere che *alcune sostanze capaci di determinare una leucocitosi non hanno azione sul decorso della piroplasmosi canina.*

***

Ho ricercato l'azione curativa di varie *sostanze coloranti*. Senza diffondermi sui dettagli delle esperienze darò soltanto i risultati di esse:

Bleu di metilene medicinale. — Questa sostanza che sembra provvista di azione curativa nella infezione malarica dell'uomo, non ha mutato in alcun modo il decorso e l'esito della piroplasmosi in 2 cani trattati con iniezioni sottocutanee giornaliere di 4 centigm. di bleu di metilene (incominciate al momento della comparsa in circolo dei parassiti).

Brillantgrün. — Due cani trattati: l'uno è stato iniettato nel peritoneo con sangue contenente pirosomi, e contemporaneamente sottocute con ½ cmc. di soluz. 0.5 % di « brillantgrün »: nessun prolungamento del periodo di incubazione, nessun ritardo nella morte.

L'altro cane è stato iniettato per due volte con 1 cmc. della stessa soluzione, dopo la comparsa dei parassiti in circolo. Decorso dell'infezione regolare: morte in 9ª giornata.

Trypanroth. — Due cani trattati, l'uno contemporaneamente all'iniezione endoperitoneale del virus, l'altro quando sono comparsi in circolo i parassiti, con 0.25 gm. della sostanza colorante.

Tutti i tessuti degli animali trattati hanno assunto un intenso color roseo. Nessuna azione del trattamento sul decorso e sull'esito della infezione.

Cl (= *diclorobenzidina* + 2 mol. di *amido-naphtol-disulfo*) (1). I primi due cani trattati con questa sostanza colorante (nella dose di 0.16 gm. *pro die* per quattro giorni consecutivi, a cominciare dal primo giorno in cui si sono rilevati all'esame microscopico i parassiti nel sangue) hanno mostrato un arresto brusco della malattia.

I parassiti sono divenuti sempre più rari finchè l'esame microscopico non ne ha più rilevato la presenza (il sangue però era sempre infettante 1 mese e 2 mesi dopo); in un cane vi è stata diminuzione dei globuli rossi, nell'altro il numero di emazie è rimasto invariato: ambedue gli animali hanno avuto durante il trattamento, e qualche giorno dopo che questo fu sospeso, leucocitosi discreta (circa 10,000 leucociti per mmc.); non vi è stato ittero o emoglobinuria, non vi sono state dopo i primi giorni altre elevazioni febbrili.

Ho dubitato però che l'esito favorevole avuto in questi due cani fosse dovuto alla loro età, giovane ma non giovanissima, e ho ripetuto perciò la prova su altri animali di 2-3 mesi. L'esito di queste prove è stato infatti sempre negativo: altri otto cani, trattati con dosi varie di Cl (da 10 a 15 centig. *pro die*) incominciando il trattamento a varia distanza dal momento dell'infezione sperimentale, sono tutti morti col reperto parassitario ed anatomico caratteristici della piroplasmosi. Cl però esercita *in vitro* una azione parassiticida: infatti un miscuglio della sostanza colorante e del virus (soluzione 5 %: tempo di contatto 15'-30') non riesce infettante (due cani).

In conclusione *quattro sostanze coloranti delle quali una efficace contro i parassiti della malaria umana, le altre scelte fra le più efficaci nelle tripanosomiasi, si sono dimostrate incapaci di esercitare alcuna azione nella piroplasmosi del cane.*

⁂

Fra i derivati dell'arsenico ho adoperato l' « atoxyl », il liquore arsenicale di Fowler e il cacodilato sodico.

Ecco i risultati finora ottenuti, che non considero ancora come definitivi, ma che mi sembrano incoraggianti a continuare su questa via e a tentarne la applicazione razionale anche in altre piroplasmosi.

Atoxyl. — Tre risultati positivi: gli animali trattati con dosi di 0.20 centig. *pro die*, incominciando la somministrazione 48 ore dopo l'inoculazione endoperitoneale del virus, non hanno mai presentato parassiti nel sangue. (Naturalmente i cani di controllo inoculati con lo stesso virus e contemporaneamente, ammalarono e morirono di piroplasmosi).

---

(1) Questa sostanza preparata secondo la formula di Nicolle e Mesnil mi è stata gentilmente inviata dalla « Farbenfabrik vorm. Friedr. Bayer u. C. » di Elberfeld.

I cani trattati con atoxyl e che non presentarono mai parassiti nel loro sangue non possiedono immunità verso una successiva inoculazione di pirosomi.

Un insuccesso nel trattamento con atoxil ho avuto in un cane al quale ho forse somministrato il medicinale in dose troppo piccola (50 centig. in quattro giorni)

Liquore arsenicale del Fowler. — Un solo cane trattato: qui il medicamento (in cani di 2-4 kg.) si può somministrare solo in piccole dosi (gm. 0.01-0.15 *pro die*). Il cane ha avuto qualche parassita nel sangue, ma il decorso dell'infezione è stato benigno.

Cacodilato sodico. — Di sette cani trattati soltanto uno ha avuto una infezione grave, terminata con la morte: si trattava di un cane barbone, e l'esperienza mi ha dimostrato che questa razza è particolarmente sensibile alla piroplasmosi.

Degli altri sei cani trattati con dosi di 15-20 centig. *pro die*, continuate per 4-6 giorni, cinque furono sottoposti alla cura 48 ore dopo la inoculazione del virus, uno quattro giorni dopo la inoculazione stessa. Tre cani si mantennero costantemente privi di parassiti, tre presentarono parassiti nel sangue, ma l'infezione decorse benigna.

Gli animali inoculati con pirosomi e trattati successivamente con cacodilato sodico, quando non abbiano mai presentato parassiti nel sangue sono sensibili come gli animali nuovi ad una ulteriore inoculazione di virus: e sono pure recettivi alla inoculazione della malattia per via naturale (in seguito alla puntura di zecche infette).

Il sangue contenente parassiti vivi tenuto a contatto per due ore a temperatura di stanza con una soluzione di cacodilato sodico all'1.80 % (isotonica con una soluzione di NaCl al 0.90 %) non perde il suo potere infettante. *Il cacodilato sodico non esplica cioè in vitro alcun potere parassiticida.*

Da queste esperienze risulta che *alcuni composti arsenicali, somministrati durante il periodo di incubazione, esercitano una azione favorevole nella piroplasmosi del cane: ora impedendo lo scoppio della malattia, ora facendo assumere a questa un decorso benigno.*

***

Riassumendo in brevi conclusioni i risultati delle ricerche sopra riferite:

1° viene confermato che *il siero fornito da animali naturalmente immuni trattati con iniezioni ripetute di tripanosomi è sfornito di ogni azione preventiva e curativa e non ha alcun potere tripanolitico in vitro;*

2° risulta che *il siero proveniente da animali con tripanosomiasi in atto, almeno nei casi da me studiati, non contiene sostanze sensibilizzatrici capaci di fissare l'alessina e rilevabili col fenomeno di Bordet e Gengou; e che lo stesso siero non contiene anticorpi tripanolitici in vitro o capaci di esplicare una azione preventiva e curativa;*

3° *nessun giovamento porta nella piroplasmosi canina una leucocitosi sperimentalmente provocata con la formazione di ascessi chimici e con le iniezioni di nucleinato sodico;*

4° *la cromoterapia, dimostratasi efficace in altre infezioni da protozoi, non esercita alcun benefico effetto nella piroplasmosi del cane, o per lo meno si mostrano sprovviste di ogni azione quelle sostanze coloranti che più sono giovevoli nella malaria dell'uomo e nella tripanosomiasi;*

5° *alcuni composti arsenicali possono impedire lo sviluppo della piroplasmosi canina, o mitigarne la gravità del decorso.*

Roma, 1° giugno 1907.

BIBLIOGRAFIA.

BAB. *Kurze Mittheilung zu dem Aufsatz von prof. Wassermann und dr. Plaut, etc.* Deut. med. Woch., 1906, p. 1985.

BALFOUR. *Trypanosomiasis in the Anglo-Egiptian Sudan.* Journ. of Path. a. Bact., 1906, XI, p. 209.

BARONI. *Il mercurio nella piroplasmosi equina.* La Clin. Vet., 1906, p. 1033 e 1057.

BERTARELLI. *Sulla sierodiagnosi della rabbia.* Il Policlinico, sez. pratica, 1907, p. 625.

BORDET et GENGOU. *De l'existence de substances sensibilisatrices dans la plupart des sérums antimicrobiens.* Ann. Inst. Past., 1901, p. 290.

ID. *Le microbe de la coqueluche.* Ann. Inst. Past., 1906, p. 731.

BREINL a. TODD. *Atoxyl in the treatment of Tripanosomiasis.* Brit. med. Journ., 1907, p. 132.

BRODEN et RODHAIN. *Le traitement de la Trypanosomiase humaine (Maladie du sommeil).* Arch. f. Schiffs-und Tropenhyg., 1906, p. 693; 1907, p. 73.

BRUMPT et WURTZ. *Agglutination du Trypanosoma Castellani-Kruse, etc.* C. R. Soc. Biol., 1903, LV, p. 1553.

ID. *Essais de traitement de la maladie du sommeil expérimentale.* C. R. Soc. Biol., 1904, LVI, p. 756.

BRUCK. *Ueber spezifische Immunkörper gegen Gonococcen.* Deut. med. Woch., 1906, p. 1368.

BUSCK u. TAPPEINER. *Ueber Lichtbehandlung blutparasitärer Krankheiten.* rif. in Bull. Inst. Past., 1906, p. 672.

CELLI. *Sull'immunità dell'infezione malarica.* Questi Ann., 1901, p. 36.

CELLI e SANTORI. *Intorno alla sieroprofilassi della malaria.* Questi Ann., 1897, p. 183.

CHICHESTER. *Arsenic in the treatment of trypanosomiasis in cattle in Nigeria.* Journ. of Trop. Med., 1904, VII, p. 196.

DETRE. *Ueber den Nachweis von spezifiche Syphilisantisubstanzen und deren Antigenen bei Luetikern.* Wien. klin. Woch., 1006, p. 619.

DIESING. *Ein Immunisierungversuch gegen Tsetsekrankheit der Rinder in Kamerun.* Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg., 1905, p. 427.

Dschunkowsky u. Luhs. *Die Piroplasmose der Rinder.* Ctbl. f. Bakt., etc., I Abt., Orig., 1904, XXXV, p. 486.

Edington rif. in Lavéran et Mesnil. *Trypanosomes et Trypanosamiases,* p. 247.

Ehrlich. *Ueber Trypanosomen.* Ctbl. f. Bakt., etc., Ref. 1907, XXXIV, p. 537.

Id. *Chromotherapeutische Trypanosomen-Studien.* Berl. klin. Woch., 1907, p. 233, 280, 310, 341.

Ehrlich u. Shiga. *Farbentherapeutische Versuche bei Trypanosomenerkrankungen.* Berl. klin. Woch., 1904, p. 329, 362.

Eitner. *Ueber den Nachweis von Antikörpern im Serum eines Leprakranken mittels Komplementablenkung.* Wien. klin. Woch., 1906, p. 1555,

Francis. *An experimental investigation of Trypanosoma Lewisi.* Bull. n. 11 Hyg. Lab. U. S. Publ. Health a. Marine Hosp. Serv., Washington, 1903.

Gengou. *Zur Kenntniss der antituberkulösen Sensibilisatoren.* Berl. klin. Woch., 1906, p. 1531.

Goebel. *Le Nagana chez la poule.* C. R. Soc. Biol., 1906, LXI, p. 321.

Gray. *Inoculation against African coast fever.* Journ. of comp. Path. a. Ther., 1904, p. 203.

Gray a. Tulloch. *Continuation Report on sleeping Sickness in Uganda.* Reports of the sleeping Sickness Comm. of the R. Society, VIII, London, 1907.

Halberstaedter. *Untersuchungen bei experimentellen Trypanosomenerkrankungen.* Ctbl. f. Bakt., etc., I Abt., Orig., 1905, XXXVIII, p. 525.

Jürgens. *Beitrag zur Biologie der Rattentrypanosomen.* Arch. f. Hyg., 1902, XLII, p. 265.

Kanthack, Durham u. Blandford. *Ueber Nagana, oder die Tsetsefliegenkrankheit.* Hyg. Rundschau, 1898, p. 1185.

Kleine rif. in Schilling. *Piroplasmosen,* p. 83.

Kleine u. Moeller. *Ein für Trypanosoma Brucei spezifisches Serum, und seine Einwirkung auf Trypanosoma gambiense.* Zeitschr. f. Hyg., 1906, LII, p. 229.

Koch. *Rhodesian redwater, or African coast fever.* Journ. of comp. Path. a. Ther., 1903, p. 273 e 390.

Id. *Ueber den bisherigen der deutschen Expedition zur Erforschung der Schlafkrankheit in Ostafrika.* Sonderbeilage zu dem n. 51 d. Deut. med. Woch., 1906.

Kopke. *Trypanosomiasis humaine,* rif. in Bull. Inst. Past., 1905, p. 671.

Krause u. Weber. *Zur Farbstoffbehandlung der künstlichen Trypanosomeninfektion.* Berl. klin. Woch., 1907, p. 192.

Lavéran. *Immunité naturelle des Cynocéphales pour les tripanosomiases, action de leur sérum sur les trypanosomes.* C. R. Acad. Sciences, 1904, CXXXIX, p. 177.

Id. *Rapport sur les travaux de Thiroux et d'Anfreville et de L. Martin.* Bull. Acad. Méd., 1907, p. 324.

Lavéran et Mesnil. *Recherches sur le trypanosome des rats, etc.* Ann. Inst. Past., 1901, p. 673.

Id. *Trypanosomes et Trypanosomiases.* Paris, Masson et C. édit., 1904.

Id. *Identification des trypanosomes pathogènes. Essais de sérodiagnostic.* C. R. Acad. Sciences, 1906, CXLII, p. 1482.

LEVADITI. *Les nouvelles recherches sur l'étiologie et la pathologie expérimentale de la syphilis.* Fol. Haemat., 1906, p. 541 e 655.

LEVADITI et MARIE. *Action du liquide céphalo-rachidien des paralytiques généraux sur le virus syphilitique.* Sem. méd., 1907, p. 251.

LEVI DELLA VIDA. *Alcune osservazioni sulla tripanosomiasi sperimentale.* Boll. R. Acc. med. di Roma, 1906, p. 287.

LIGNIÈRES. *La piroplasmose bovine: nouvelles recherches et observations.* Arch. Parasit., 1904, p. 398.

ID. *Les maladies tropicales des animaux domestiques,* rif. in Bull. Inst. Past., 1905, p. 946.

LINGARD. *Report on Sarra.* Bombay, 1899, vol. 2°, p. 61.

LOUNSBURY. *Ticks and malignant jaundice of the dog.* Journ. of comp. Path. a. Ther., 1904, p. 113.

MANGALHAES (de). *De l'action des composés arsénicaux et du vert brillant sur le Trypanosoma gambiense et le Trypanosoma Brucei.* Arch. de R. Inst. bact. Camara Pestana, 1907, pag. 319.

MARCHOUX. *Piroplasma canis (Lav) chez les chiens du Sénégal.* C. R. Soc. Biol., 1900, p. 97.

MARIE et LEVADITI. *Les anticorps syphilitiques dans le liquide céphalo-rachidien des paralytiques généraux et des tabétiques.* Ann. Inst. Past., 1907, p. 138.

MARTIN. *Cinq nouveaux cas de trypanosomiase chez les blancs.* Ann. Inst. Past., 1907, p. 161.

MARTINI. *Untersuchungen über die Tsetsekrankheit zwecks Immunisierung der Haustieren.* Zeitschr. f. Hyg., 1905, L, p. 1.

MASSAGLIA. *L'azione del cacodilato di sodio nelle tripanosomiasi sperimentali.* Riforma med., 1907, p. 180.

MAYER. *Experimentelle Beiträge zur Trypanosomeninfektion.* Zeitschr. f. exp. Ther. u. Pat., 1905, p. 539.

MEMMO, MARTOGLIO e ADANI. *Infezioni protozoarie negli animali domestici in Eritrea (Piroplasmosi e tripanosomiasi).* Questi Ann., 1905, p. 1.

MESNIL et MARTIN. *Sur la réceptivité des Oiseaux aux trypanosomes pathogènes pour les mammifères.* C. R. Soc. Biol., 1906, LX, p. 739.

MESNIL, NICOLLE et AUBERT. *Recherches sur le traitement des infections expérimentales à Trypanosoma gambiense.* Ann. Inst. Past., 1907, p. 1.

MOORE. *On the beneficial effecte of sodium arseniat..... in Tse-fly desease in cattle.* Lancet, 1904, 2°, p. 15.

MOORE, NIERESTEIN a. TODD. *A note on the therapeutics of trypanosomiasis.* Ann. of trop. Med. a. Par., 1907, 1°, p. 161.

MORGENROTH u. STERTZ. *Ueber den Nachweis Syphilitischer Antikörper in Liquor cerebrospinalis von Paralytikern, etc.* Virch. Arch., 1907, CLXXXVIII, p. 166.

MOTAS. *Contribution à l'étude de la piroplasmose ovine (carceag.),* rif. in Bull. Inst. Past., 1904, p. 580.

MULLER u. OPPENHEIM. *Ueber den Nachweis von Antikörpern in Serum eines an Arthritis gonorrhoica Erkranken mittels Komplementablenkung.* Wien. klin. Woch., 1906, p. 894.

NEAVE. *Note on the use of Chrysoidin in human trypanosomiasis.* Lancet, 1905, 1°, p. 1645.

NEISSER, BRUCK u. SCHUCHT. *Diagnostische Gewebs- und Blutuntersuchungen bei Syphilis.* Deut. med. Woch., 1906, p. 1937.

NEISSER u. SACHS. *Die forensische Blutdifferenziernng durch antihaemolytische Wirkung.* Berl. klin. Woch., 1905, p. 65.

ID. *Bemerkungen zu der von prof. Uhlenhuth, etc.* Berl. klin. Woch, 1906, p. 1580.

NEUFELD u. HÜNE. *Untersuchungen über baktericide Immunität und Phagocytose nebst Beiträgen zur Frage der Komplementablenkung.* Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte, 1907, p. 164.

NICOLLE et MESNIL. *Traitement des tripanosomiases par les couleurs de benzidine.* Ann. Inst. Past., 1906, p. 417 e 513.

NISSLE. *Beobachtungen am Blute mit Trypanosomen geimpfter Tiere.* Arch. f. Hyg., 1905, LIII, p. 181.

NOCARD. *Sur les rapports qui existent entre la dourine et le surra ou le nagana.* C. R. Soc. Biol., 1901, p. 464.

NOCARD et MOTAS. *Contribution à l'étude de la piroplasmose canine.* Ann. Inst. Past., 1902, p. 257.

NOBBELE (de) et GOMBEL. *Essais de radiothérapie dans les trypanosomiases expérimentales.* Ann. Soc. méd. de Gand, 1906, LXXXVI, p. 52.

RABINOWITSCH u. KEMPNER. *Beitrag zur Kenntniss der Blutparasiten, speciell der Rattentrypansomen.* Zeitschr. f. Hyg., 1899, XXX, p. 251.

ID. *Die Tripanosomen in Menschen- und Thierpathologie, etc.* Ctbl. f. Bakt., etc., I Abt., Orig., 1903, XXXIV, p. 804.

RODET et VALLET. *Sur l'infection expérimentale par le Tryp. Brucei. — Destruction du parasite dans la rate.* C. R. Acad. Sciences, 1906, CLII, p. 1229.

ID. *Contribution à l'étude des trypanosomiases. Recherches expérimentales sur le Trypanosoma Brucei.* Arch. Méd. expér., 1906, p. 450.

ID. *Nagana expérimental. Sur les variations du nombre des trypanosomes dans le sang du chien. Trypanolyse intravasculaire.* C. R. Acad. Sciences, 1906, CLIII, p. 327.

ROST. *Report on the possibility of treating « Surra » by injections of an antiparasitic serum.* Journ. of Path. a. Par., 1901, p. 289.

ROGET rif. in LAVERAN et MESNIL. *Trypanosomes et Trypanosomiases,* p. 298 e 299.

SCHANDINN. *Studien über Krankheitserregende Protozoen.-Plasmodium vivax, etc.* Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte, 1903, p. 169.

SCHILLING. *Bericht über die Surrakrankheit der Pferde.* Ctbl. f. Bakt., etc., I Abt., Orig., 1901, XXX, p. 545; 1902, XXXI, p. 452.

ID. *Versuche zur Immunisierung gegen Testsekrankheit.* Zeitschr. f. Hyg., 1905, LII, p. 149.

ID. *Piroplasmosen,* in KOLLE u. WASSERMANN. *Handbuch der path. Mikroorganismen.* Erganzungsband, I Heft, p. 76.

SCHRÖDER rif. in SCHILLING. *Piroplasmosen,* p. 84.

SCHÜTZE. *Ueber forensischen Wert des Neisser-Sachs' schen Verfahrens der Komplementablenkung.* Berl. klin. Woch., 1906.

ID. *Experimenteller Beitrag zur Wassermannschen Serodiagnostik bei Lues.* Berl. klin. Woch., 1907, p. 12.

SEVIN. *Sur l'action trypanolytique du sérum de rat.* C. R. Soc. Biol., 1905, LIX, p. 122.

STOCKMANN. *Some points to be considered in connection with Rhodesian fever.* Journ. of comp. Path. a. Ther., 1905. p. 64.

THEILER. *Beitrag zur Frage der Immunität bei der Piroplasmosis des Hundes.* Ctbl. f. Bakt., etc., I Abt., Orig., 1904, XXXVII, p. 401.

ID. *Farther notes on piroplasmosis of the Horse, Mule and Donkey.* Journ. of comp. Path. a. Ther. 1905, p. 219.

THEILER u. STOCKMANN. *Farther experiments to determin how long an area remains infected with East Coast fever.* Journ. of comp. Path. a. Ther., 1905, p. 163.

THIROUX. *Sur les propriétés préventives du sérum de deux malades atteints de Trypanosomiase humaine.* C. R. Soc. Biol., 1906, LX, p. 776.

THOMAS. *Some experiments in the treatement of trypanosomiasis.* Brit. med. Journ., 1905, p. 1140.

THOMAS a. BREINL. *Trypanosomes, Trypanosomiasis and « Sleeping-Sikness ».* Liverpool School of trop. Med., mem. XVI, 1905.

TODD. *The treatement of human trypanosomiasis by Atoxil.* Brit. med. Journ., 1906, p. 1037.

UHLENHUTH. *Komplementablenkung und Blut-Eiweissdifferenzierung.* Deut. med. Woch., 1906, p. 1244.

UHLENHUTH, GROSS u. BICKEL. *Untersuchungen über die Wirkung des Atoxyl auf Trypanosomen und Spirochaeten.* Deut. med. Woch., 1907, p. 129.

VANNOD. *Ueber Agglutinine und spezifische Immunkörpern im Gonococcenserum.* Deut. med. Woch., 1906, p. 1984.

WASSERMANN u. BRUCK. *Experimentelle Studien über die Wirkung von Tuberkelbacillen-Präparaten auf den tuberkulös erkrankten Organismus.* Deut. med. Woch., 1906, p. 450.

WASSERMANN, NEISSER u. BRUCK. *Eine serodiagnostische Reaktion bei Syphilis.* Deut. med. Woch., 1906, p. 745.

WASSERMANN, NEISSER, BRUCK u. SCHUCHT. *Weitere Mittheilung über den Nachweis spezifisch-luetischer Substanzen durch Komplementverankerung.* Zeitschr. f. Hyg., 1906, LV, p. 451.

WASSERMANN u. PLAUT. *Ueber das Vorhandensein syphilitischer Antistoffe in der Cerebrospinal Flussigkeit.* Deut. med. Woch., 1906, p. 1769.

WENDELSTADT u. FELLMER. *Ueber die Wirkung von Malachitgrün und anderen verschiedenartigen Stoffen gegen Naganatrypanosomen bei weissen Ratten.* Deut. med. Woch., 1904, p. 1711.

ID. *Behandlung der Tsetsekrankheit mit Brillantgrün.* Deut. med. Woch., 1906, p. 863; Zeitschr. f. Hyg., 1906, LII, p. 263.

ZIEMANN. *Vorläufiger Bericht über das Vorkormmen des Texasfieber der Rinder in Kamerun und weiteres über die Tsetsekrankheit und über die « Tiermalaria ».* Deut. med. Woch., 1903, p. 289.

Nota aggiunta durante la correzione delle bozze. — Durante la correzione delle bozze è venuta a mia conoscenza una comunicazione fatta dal prof. Casagrandi alla Società fra i cultori delle scienze mediche e naturali in Cagliari sulla *Diagnosi della malaria latente* (Il Policlinico, sez. pratica, 1905, p. 718). Il Casagrandi riferisce che il siero dei malarici guariti o in via di guarigione avrebbe un potere fissatore sulle proprie emazie. Il lavoro è ancora troppo brevemente accennato perchè se ne possa trarre la conclusione che si tratti effettivamente della presenza nel sangue dei malarici di antisostanze capaci di deviare il complemento secondo il metodo di Bordet e Gengou.

Istituto d'igiene dell'Università di Bonn

Nuovi studi sull'infezione peritoneale sperimentale

per i dottori D. PANE e C. LOTTI.

Per spiegare come l'organismo animale si difende contro le infezioni, vi sono, come è noto, almeno tre dottrine diverse: la prima creata e da lungo tempo difesa dal Metschnikoff, attribuisce tutta l'importanza ai leucociti, i quali o per mezzo della fagocitosi o come produttori di alessina libera in seguito al loro dissolversi, distruggono i germi invasori; la seconda, che nega quasi ogni importanza ai leucociti come fagociti, e ritiene la batteriolisi per opera dei succhi organici la causa unica di distruzione dei germi nell'organismo; la terza infine, più recente, che cerca di collegare in una sola le due prime.

Quantunque dai seguaci dell'una e dell'altra teoria sia raccolta una gran copia di argomenti, purtuttavia la difficile questione resta ancora aperta; ed è per ciò che sulla proposta e sotto la direzione del prof. Kruse, anche noi abbiamo ad essa diretti i nostri sforzi, cercando di *seguire passo a passo, meglio di quel che fu fatto fino ad ora, e per così dire quantitativamente, il decorso di diverse infezioni sperimentali nel peritoneo della cavia.*

Le infezioni da noi studiate furono quelle determinate dal *B. prodigiosus*, del carbonchio. e sovratutto del colera e della dissenteria. L'esame *intra vitam* era quello comunemente usato: di tempo in tempo si estraeva con pipetta capillare un po' di liquido dal peritoneo, e di esso venivano fatti non solo preparati in goccia pendente e colorati, ma anche piastre in agar per la conta dei germi, *in modo da avere una misura più esatta dei microrganismi ancora viventi.* Allo stesso scopo, appena morto od ucciso l'animale, ne veniva immediatamente eseguita l'autopsia. Dopo avere ben rasi i peli e disinfettata la pelle con soluzione di sublimato 1 $^{0}/_{00}$, previa lavanda con alcool, ed allontanato l'antisettico con soluzione fisiologica di cloruro di sodio, si apriva anzitutto, con strumenti sterili e colle più rigorose misure di asepsi, la cavità toracica. Messo a nudo il cuore, lo si toccava con una

sottile lamina arroventata, e mentre l'organo veniva tenuto fisso con una pinza sterile, si penetrava con una pipetta, mercè movimenti delicati di succhiello, in una delle cavità ventricolari, donde si aspirava un poco di sangue. Col sangue così raccolto si facevano piastre, da servire per la conta, usando per ciascuna di esse la quantità di due goccie. La piccola manovra suddescritta, se bene eseguita, permette di non far cadere sangue dal cuore nella cavità toracica. Subito dopo si escideva un pezzo di polmone, che veniva trattato come gli altri organi, di cui si dirà in seguito.

Aperto il cavo addominale, anzitutto si misurava con pipette sterili la *quantità di liquido*, si notava il colorito di questo e la densità, si portava l'attenzione su possibili depositi fibrinosi nuotanti nel liquido o depositati alla superficie dei visceri addominali. Col liquido addominale, e da diversi punti, venivano fatte piastre, o direttamente o per mezzo di diluizioni, se il gran numero dei germi lo richiedeva: nè si omettevano preparati in goccia pendente e colorati. In alcuni casi inoltre, per trovare più accuratamente il numero dei germi contenuti nella cavità addominale, venivano lavati ripetutamente l'intestino e gli altri visceri con determinata quantità di soluzione fisiologica, da cui ugualmente venivano fatte piastre. In ultimo si determinava il contenuto batterico dei singoli organi dell'addome. Prima veniva estratto l'omento, di cui una parte era distesa su un vetrino coprioggetti e fissata, mentre la rimanente veniva trattata come gli altri organi; in seguito la milza, il rene ed il fegato.

Detti organi, ad eccezione dell'omento, erano estratti in totalità e ripetutamente lavati in soluzione fisiologica, quindi in alcool e brevissimamente in etere, che si lasciava in seguito evaporare in scatole doppie di vetro, sterili.

Di ciascun organo addominale (meno l'omento) si bruciava una parte della superficie con una sottile lamina di metallo arroventata, e attraverso la parte bruciata, si escideva con forbici sterili un pezzetto di organo dalla parte centrale. I pezzetti escissi venivano separatamente triturati in mortai di porcellana, emulsionati con 10 cc. di brodo sterile o meno, a seconda dei casi: dalla emulsione una o due goccie venivano portate con pipetta sterile in tubi di agar tenuti a 40°-45°, e con questi in ultimo si facevano piastre.

D'altra parte dagli organi venivano fatti preparati per strisciamento, mentre dei piccoli pezzi fissati in alcool ed inclusi in paraffina, venivano sezionati e colorati con vari metodi, preferibilmente però con bleu di metilene alcalino di Löffler.

La porzione di omento distesa su vetrino coprioggetti è fissata in alcool, se si trattava di germi non colorabili col Gram, veniva colorata col bleu di metilene di Löffler. Dopo, lavato il preparato accuratamente in acqua, ed asciugato con sottile carta bibula, era brevemente tenuto in alcool assoluto, di nuovo asciugato, e finalmente immerso in xilolo, da cui si estraeva ancora un paio di volte, per sottrargli possibilmente, mercè carta bibula, tutta l'acqua ancora contenuta. Infine veniva incluso in balsamo del Canadà.

Se il germe iniettato era colorabile col Gram, allora si eseguiva sull'omento il metodo Gram-Weigert.

Tutto il resto dell'omento veniva triturato in un mortaio, e da esso, mediante diluizioni come per gli altri organi, si facevano piastre, di cui si contavano le colonie sviluppatesi.

Quanto ai preparati colorati sul vetrino, diciamo subito che il metodo tanto raccomandato dal Radziewski (1) (fare agire un'ora la soluzione di Ziehl, diluita con acqua distillata nella proporzione di 1.30) si è dimostrato insufficiente, attesochè oltre a non avere niente di specifico, poichè il bleu di metilene alcalino di Löffler rende eguali servigi, i risultati che si ottengono non sono affatto proporzionali alla diminuzione dei germi, osservato col metodo delle piastre. Si osservano, è vero, sia con la fucsina che con la soluzione di Löffler, alterazioni dei germi liberi, ma in modo incostante e non tale, che su questo reperto si possa decisamente fondare un sicuro giudizio. Senza contare poi, che talvolta, nonostante tutta l'attenzione per fare buoni preparati dell'essudato, questi sono talmente ricchi di precipitati, che non si può dire niente sulle alterazioni dei germi. Si capisce che malgrado ciò, abbiamo determinato il meglio possibile le deformazioni morfologiche, ed in particolar modo la formazione di granuli; ma abbiamo creduto preferibile dare il maggior peso all'esame comparativo dei germi nell'essudato, per mezzo di piastre, eseguite di tempo in tempo, e sempre colla stessa quantità di materiale, tenendo in debito conto, il risultato dei preparati colorati, specialmente per ciò che concerne la fagocitosi.

Oltre agli esperimenti *in vivo*, credemmo opportuno eseguire anche ricerche *in vitro*, per constatare il rapporto tra alcuni resultati, attesochè già da alcuni AA. si è fatta valere la corrispondenza che molte volte ha luogo tra esperienze in animali ed *in vitro*. Del resto, per chiarire alcuni fenomeni, le esperienze *in vitro* sono nelle condizioni attuali indispensabili.

Anche in questi esperimenti, usammo certe nuove disposizioni, che ci permettevano di determinare, quasi in un momento dell'infezione, il potere microbicida del liquido peritoneale: cioè *usammo le gocce pendenti, per coltivarvi in termostato i germi in esse contenuti*, e farne quindi dopo vario tempo delle piastre, sì da poter stabilire il loro aumento o diminuzione.

Di più vennero istituite altre ricerche di confronto tra il potere battericida ed opsonico del liquido peritoneale col siero di sangue della stessa cavia, e ciò tanto nell'animale normale, quanto in quello trattato con aleurone od immunizzato. Per queste rimandiamo ad altra parte del lavoro.

Esperienze col bacillo prodigioso.

Con questo batterio abbiamo fatto solo degli esperimenti preliminari, per conoscere meglio il metodo di ricerca; ma risultava dagli esperimenti in serie di animali (iniettando $^1/_{20}$ di cultura in agar, dose generalmente non letale nelle nostre esperienze) che la quantità di germi nel liquido peritoneale va gradatamente diminuendo, di guisa che essa ordinariamente

(1) Zeitschrift f. Hygiene, Bd. XXVII, 1901.

dopo 5 ore dall'iniezione è molto ridotta, fino alla scomparsa quasi completa che in generale si osserva dopo 24 ore.

Importante poi è il fatto che i leucociti peritoneali dapprima diminuiscono notevolmente, e solo dopo 5-6 ore, compaiono di nuovo, in gran parte in ammassi. Forse questa ricomparsa tardiva dipende da speciali sostanze tossiche del prodigioso, che debbono prima essere assorbite. Esiste precoce la fagocitosi, ma se ad essa spetti il posto principale nella distruzione dei batteri, le nostre ricerche non ci permettono di stabilire con sicurezza.

Cavia $^1/_{20}$ di cultura in agar i. p.

Cavia 1. 570 gr., uccisa dopo 15'.

Dopo 5' si vedono nel liquido peritoneale estratto col capillare pochi leucociti e molti batteri.

Dopo 15' viene uccisa. Scarso essudato (0.5 cc.) molti batteri, discreto numero di leucociti, chiara fagocitosi.

Piastre.

Liquido peritoneale 250 milioni.
Cuore (miocardio) 100 colonie.
Fegato 3000 colonie.
Polmone 3000 colonie.
Sangue 0.
Ghiandole linfatiche del collo 0.

Cavia 2. 440 gr., uccisa dopo ore 3.30.

Dopo 3 ore. Poco essudato come nell'animale 1.

Nell'essudato libero pochi leucociti, pochi batteri, discreto numero di globuli rossi.

Piastre.

Liquido peritoneale 900,000.
Cuore 0.
Fegato 0.
Polmone 1.
Sangue 0.
Ghiandole linfatiche 0.

Cavia 3. 470 gr., uccisa dopo 5 ore.

Ricevette oltre la dose comune i. p. anche la stessa dose sotto cute.

Dopo 3 ore pochi batteri, molti corpuscoli.

Dopo la morte molto essudato sanguigno, senza batteri.

Piastre.

Liquido peritoneale 300,000.
Cuore 100.
Fegato 0.
Polmone 20.
Sangue 9.
Ghiandole linfatiche — (*significa che fu per qualche accidente tralasciata la osservazione*).

Cavia 4. 470 gr., uccisa dopo ore 5.30.

Prima della morte si aspira essudato emorragico apparentemente senza batteri.

Dopo la morte si vedono pochi leucociti, scarsi batteri. Preparati per strisciamento dalla superficie del fegato e della milza, lasciano vedere ammassi di leucociti, e bacilli in gran parte alterati.

Piastre.

Essudato 75,000 (?).
Cuore 40.
Fegato 0.
Polmone 20.
Sangue 11.
Ghiandole linfatiche 0.

Cavia 5. 470 gr., uccisa dopo 4 giorni.

Dopo 2 ore fino a dopo 3 ore, molti bacilli, pochi leucociti.

Dopo 5 ore pochi batteri, ricca e viva fagocitosi.

Dopo 9 ore scarsi batteri liberi, grossi leucociti, cumuli di cellule, che contengono (in parte) bacilli apparentemente alterati.

Dopo 24 ore cumuli di leucociti e pochi germi. Fagocitosi.

Dopo 48 ore 1 ansa di essudato peritoneale contiene circa 100 bacilli. Molti leucociti polinucleari. Fagocitosi degli scarsi batteri. Macrofagociti. Non si vedono accumuli di leucociti.

Piastre.

Essudato peritoneale 0.
Sangue 0.
Fegato 37,000.
Polmone 7000.
Milza 30.
Rene 0.
Midollo 0.
Ghiandole linfatiche 100.

Mentre questo è, in breve, il quadro generale dell'infezione non letale, vi sono animali più sensibili, che con la stessa dose, invece di presentare diminuzione, presentano aumento dei germi, e morte dopo 6 ore.

Cavia 6. 450 gr. Muore dopo 6 ore

Dopo 3 ore si vedono nell'essudato libero molti batteri.

Presenza di leucociti, fagocitosi. Il reperto è lo stesso fin dopo 5 ore.

Dopo 5 ore e 30 sembra essere avvenuto un certo aumento di bacilli. Si vedono grandi ammassi di leucociti.

Piastre.

Essudato libero 200 milioni.
Cuore (miocardio) 0.
Fegato 15,000.
Polmone 0.
Sangue 0.
Ghiandole linfatiche 0.

Questo fatto non è del resto singolare, ma vedremo esistere anche in altre infezioni una certa incostanza dei resultati, ciò che appunto rende difficile l'interpretazione del decorrere del processo infettivo. Nel caso mortale succitato si è visto come l'essudato estratto poco tempo prima della morte, mostrava abbondante numero di leucociti anche in ammassi e fagocitosi. La fagocitosi dunque con l'anzidetta dose si manifesta in tutto il decorso dell'infezione, a cominciare da 15'-20' dopo l'iniezione sino alla morte, quando questa per una speciale sensibilità dell'animale eventualmente si verifica.

Col metodo delle piastre si ritrovano sempre nel liquido peritoneale dei germi, sino a 2-3 giorni dopo l'infezione, ma in numero molto scarso.

Questi esperimenti col B. prodigioso ci dovevano istruire prima di tutto sull'assorbimento dei germi nel circolo generale, e sulla sorte che subiscono negli organi interni. Nel sangue non ci è occorso di riscontrarne se non in scarsissimo numero, mentre negli organi esaminati (fegato, polmone) ne sono stati riscontrati quasi costantemente ed in numero maggiore, anche dopo 3-4 giorni, quando il contenuto bacillare nel cavo peritoneale è enormemente disceso. E possono trovarsene anche nelle ghiandole linfatiche, mentre non vi si trovano nelle prime 6-8 ore.

Un tal fatto ricorda la teoria di Manfredi (1) secondo la quale, i germi, entrati nel sangue, successivamente compaiono nelle ghiandole linfatiche. Ma dobbiamo dire che questa è piuttosto un'eccezione. In altri esperimenti col prodigioso e col tetrageno, iniettati sotto cute, abbiamo trovato batteri nella milza, nel fegato e nel polmone, ma quasi mai nelle ghiandole, situate a distanza del processo infettivo: solo ve ne erano in quelle in rapporto colla circolazione linfatica della regione infetta, e ciò è facilmente comprensibile.

Carbonchio.

Passando al carbonchio, facemmo esperienze con bacilli avirulenti, virulenti e con spore, iniettando in alcune esperienze contemporaneamente anche un'emulsione in acqua di polvere di carminio, seguendo in ciò l'esempio di *van Leent* (2), il quale ottenne che le sostanze corpuscolari miste ai bacilli del carbonchio, rendono più grave il quadro morboso.

Iniettando carbonchio avirulento alla dose di 1 cmc. di brodo-cultura,

---

(1) Questi Annali, vol. VIII, 1898, e Virchow's Archiv, Bd. 155.
(2) Centr. f. Bakt., Bd. XXVIII, 1900.

insieme ad 1 cmc. di emulsione di carminio, si osserva già dopo 5'-10' diminuzione di bacilli e di leucociti nel liquido peritoneale; uccidendo l'animale dopo 20' si vedono sull'omento ammassi di leucociti e di grosse cellule mononucleari, proprie del liquido peritoneale, e con essi impigliati bacilli e granuli di carminio, che appaiono riccamente fagocitati.

Senza entrare qui ad esporre minutamente il processo della fagocitosi, in specie degli elementi fissi, ciò che sarà fatto in un lavoro speciale da uno di noi (Dr. Pane) diremo che nei preparati eseguiti con il liquido peritoneale si cominciano a vedere fagociti già poco tempo dopo l'iniezione (10'-15'). Il numero dei fagociti è maggiore dopo un certo tempo quando gli elementi estratti col capillare sono anche in maggior numero. Contribuiscono alla fagocitosi elementi polinucleari e grossi mononucleari. Nei preparati dell'omento è constatabile fagocitosi oltre che dei leucociti e dei grossi mononucleari che si trovano sempre depositati alla sua superficie in seguito ad iniezioni intraperitoneali di culture batteriche, di due altre specie di elementi. Cioè alcune cellule allungate con nucleo fusiforme e che accompagnano i vasi e sembrano corrispondere agli elementi connettivali descritti da Marchand (1) e da questo autore identificati con i clasmatociti di Ranvier, ed alcune grosse cellule a nucleo unico rotondeggiante che col bleu di metilene si colora meglio del nucleo delle cellule endoteliali in generale. Se queste cellule sono anche cellule endoteliali modificate, non potremmo con sicurezza affermarlo. Certo è che esse hanno rapporto di continuità con gli altri elementi di rivestimento coi quali o fanno un solo corpo o sono per lo meno attaccate con una parte della loro superficie.

Talvolta detti elementi formano dei piccoli gruppi di 3-4 essendo più ravvicinati tra di loro delle restanti cellule di rivestimento.

In tal caso però non tutti gli elementi del gruppo sono fagociti. La fagocitosi da parte di questi elementi fissi salvo rarissime eccezioni è di gran lunga inferiore a quella esercitata dai leucociti e dai grossi mononucleari.

Procedendo oltre nell'osservazione di animali in serie, uccidendoli dopo più lungo tempo, si osservano dopo 2-4 ore gli stessi fatti ed una più inoltrata alterazione dei bacilli nell'interno dei fagociti.

Dopo 8-10 ore comincia ad osservarsi abbondante afflusso di leucociti; dopo 24 ore la leucocitosi è molto intensa. e se si uccide in questo momento l'animale, si trovano molti ammassi di elementi cellulari sull'omento, ma nessun germe, e l'infezione appare così completamente esaurita.

Notevole è in quest'ultimo caso la ricchezza di elementi mononucleari del liquido peritoneale con nucleo talora piegato a ferro di cavallo ricchi di protoplasma, che qua e là presentano nel loro interno leucociti fagocitati in uno stato di maggiore o minore dissoluzione.

---

(1) Verhandlungen der deutsch. pathol. Gesellschaft, I e IV Tagung, 1899-1902.

Carbonchio non virulento.
Cavie 1 cc. di cultura in brodo + 1 cc. di emulsione di carminio i. p.

Cavia 1. 450 grm., uccisa dopo 20'.

Dopo 2'. Moltissimi bacilli accanto alle ordinarie cellule del liquido peritoneale. Nessun fagocita.

Dopo 5'. Diminuisce il numero dei bacilli e dei leucociti.

Dopo 10'. Progressiva diminuzione dei bacilli e dei leucociti.

Viene uccisa dopo 20'. Omento. Numerosi bacilli, che mancano nell'essudato libero, in massima parte mescolati con ammassi di cellule e di granuli di carminio. Questi ammassi sono costituiti da leucociti polinucleari e da grossi fagociti mononucleari. Pronunziata fagocitosi da parte di questi elementi. Alcuni pochi bacilli sono liberi sull'omento e lontani dalle cellule,

Piastre (da una piccola ansa).

Essudato libero, 18 colonie in tutto.
Id. dalla parte addominale, 4.
Id. dalla superficie del fegato, 4.
Id. dalla parete esterna dell'intestino, 3.
Id. dalla superficie dell'omento, 6.

Cavia 2. 530 grm., uccisa dopo 30'.

Il reperto è come nell'animale 1, solo che la degenerazione dei bacilli nell'interno dei fagociti è più progredita.

Piastre (piccola ansa).

Essudato libero, 2 in tutto.
Id. dalla parete, 1.
Id. dalla superficie del fegato, 0.
Id. dalla parete esterna dell'intestino, 1.

Cavia 3. 430 grm., uccisa dopo 2 giorni.

Dopo 20' si osservano nel liquido peritoneale molte cellule mononucleari in parte in ammassi, i bacilli sono straordinariamente rari. Alcuni granuli di carminio sono già stati fagocitati.

Dopo ore 1,30 quasi soltanto cellule mononucleari, che non sono in gran numero. Alcune evidentemente hanno fagocitato granuli di carminio. Non si vedono bacilli.

Dopo 3 ore eguale reperto.

Dopo 24 ore, ricca leucocitosi, grosse cellule mononucleari e piccoli polinucleari.

Viene uccisa dopo 48 ore.

Omento. — I vasi dell'omento sono pieni di linfociti; sulla superficie libera si vedono ammassi di leucociti e di elementi mononucleari, di cui alcuni sembrano cellule endoteliali. Mancano germi.

Bacilli frammentati, come si possono vedere sia col metodo Radziewsky sia col bleu di metilene, sono piuttosto scarsi. La quantità di

leucociti che si osserva nell'essudato dopo 5-7 ore, non è in tutti i casi la stessa, poichè talora è discreta, altre volte invece scarsissima.

Ma se tale è il caso dei leucociti liberi nel liquido peritoneale, non è così per quelli depositati sull'omento, i quali sono sempre numerosi, e spesso contengono nel loro protoplasma dei bacilli, anche quando l'infezione è letale, e l'osservazione si fa poco tempo dopo la morte.

In tal caso si osserva appunto la diversa distribuzione dei germi, più abbondanti in alcuni punti, talora in ammassi, meno abbondanti altrove; fatto che paragonato alla notevole distruzione batterica in un primo tempo dell'infezione, fa supporre, come già dicevamo, che i bacilli sopravvissuti in alcuni focolai, abbiano in seguito potuto ulteriormente moltiplicarsi.

Riguardo al comportamento degli animali rispetto al bacillo del carbonchio virulento, si osserva anzitutto che non vi è differenza apprezzabile, se s'inietta contemporaneamente carminio, o no, sia per ciò che riguarda il risultato finale, sia per ciò che spetta al processo morboso in sè stesso.

Nell'uno e nell'altro caso si osserva fagocitosi, che sembra raggiungere il suo massimo due o tre ore dopo l'iniezione, ed è maggiore o minore a seconda dei singoli individui. Notevole è sempre l'ammasso di leucociti e batteri, già constatato nelle precedenti esperienze. I bacilli dapprima diminuiscono sensibilmente per poi aumentare di nuovo, e, come preparati dell'omento dimostrano, stante l'irregolarità di sviluppo di essi nei vari punti, si va a pensare che i germi originali in gran parte siano andati distrutti, e che dai sopravvissuti abbiano avuto origine quelli, che poi, moltiplicandosi incessantemente, conducono l'animale a morte.

E' interessante inoltre il fatto che molti germi crescono a filamenti, intersecando grossi fagociti mononucleari e leucociti, e dando in tal modo l'impressione come se il germe dapprima fagocitato, siasi in seguito sviluppato come filamento. In altre parti si vedono bacilli, ammassati sotto forma di strisce, che seguono la direzione dei vasi.

La dose di 1 cmc. di cultura in brodo del nostro carbonchio virulento, è letale per la cavia di 250-300 gm. Gli animali muoiono dopo 7-8 ore e talvolta anche prima. I germi quasi tutti liberi nell'essudato mostrano una capsula, che, colorando il preparato con bleu di metilene, si mostra rossastra.

Carbonchio virulento. — Cavie. Iniezione intraperitoneale di 1 cmc. di cultura in brodo, senza contemporanea iniezione di emulsione di carminio.

Cavia 4. Uccisa dopo 30'.
Nel liquido peritoneale si vedono pochi leucociti e scarsi bacilli.
Un'ansa di detto liquido dopo 30' contiene 45 germi in media (piastra).

Cavia 5. Uccisa dopo ore 1.30.
Nel liquido peritoneale si osservano leucociti in maggior numero che nell'animale 1. Scarsi bacilli.

Cavia 6. Uccisa dopo ore 4.30.
Nel liquido peritoneale molti leucociti, pochi bacilli. Un'ansa del detto liquido ore 4.30 dopo l'iniezione contiene 40 germi in media.

Cavia 7. Morta dopo 8 ore.
Dopo 15' pochi leucociti e scarsi bacilli piuttosto piccoli.
Dopo 30' pochi leucociti, scarsi bacilli.
Dopo 1 ora leucociti cresciuti di numero, come pure i bacilli. Messo il preparato in termostato, e lasciatovelo 2 ore, si nota aumento di germi e chiara fagocitosi.
Dopo 3 ore molti leucociti, nessun bacillo.
Dopo 8 ore mediocre numero di leucociti, molti bacilli, tutti all'esterno degli elementi cellulari.
Muore dopo 8 ore. Liquido peritoneale discretamente abbondante, edema sottocutaneo.
Omento. Ammassi di elementi cellulari, a preferenza leucociti. Resti batterici mal colorati, alcuni in lunghi filamenti. Pochi bacilli ben colorati, egualmente disseminati sull'omento, senza speciale preferenza per gli ammassi. Discreta fagocitosi. Origine dei germi dubbia, forse da qualche focolaio isolato.

Piastre dell'essudato (una grossa ansa).

Dopo 16' 50 colonie in tutto.
Dopo 1 ora 250 colonie.
Dopo 8 ore 1500 colonie.

Cavia 8. Muore nella notte.

Carbonchio virulento. — Cavie. 1 cmc. di cultura in brodo + 1 cmc. di emulsione di carminio i. p.

Cavia 9. 430 gm., viene uccisa dopo un'ora.
Reperto. Circa 2 cmc. di essudato emorragico, che contiene scarso numero di germi. Pochi leucociti e pochissimi fagociti. Preparati per strisciamento fatti dalla superficie del fegato mostrano qua e là grandi ammassi di leucociti. Specialmente abbondanti sono questi ammassi sullo omento; in essi si osservano molti bacili e granuli di sostanze colorate.

Osservando più attentamente si vede che i fagociti in gran parte sono elementi mononucleari, dei quali alcuni rassomigliano molto alle cellule endoteliali, altri hanno un nucleo a ferro di cavallo. Accanto a questi si vedono anche leucociti polinucleari.

Dopo un'ora il numero dei germi è fortemente diminuito.

Cavia 10. 420 gm., viene uccisa dopo 2 ore.

Reperto. A prima vista è lo stesso che nell'animale 1. Microscopicamente si vedono nell'essudato libero pochi bacilli ben colorati e provvisti di capsula. Abbastanza leucociti, di cui pochi contengono bacilli nel loro interno.

Omento fissato *in toto* in alcool e colorato il giorno successivo. Numerosi ammassi di cellule migrate. Cellule endoteliali a grosso nucleo alla rinfusa con leucociti polinucleari e che contengono numerosi bacilli e granuli di sostanza colorante. In altri punti queste cellule endotelioidi sono, rispetto ai leucociti, scarsissime. Fagociti sia tra i leucotici, che tra le cellule endotelioidi, che contengono in generale maggior quantità di granuli di sostanza colorante, anzichè di bacilli. Filamenti bacillari si trovano sull'omento, benchè scarsi, dove non esistono ammassi di cellule. Gli ammassi talora si presentano sotto forma di strisce, che accompagnano i vasi sanguigni.

Preparati per strisciamento della superficie del fegato e degli altri organi addominali, mostrano pochi elementi cellulari e scarsi bacilli. In quelli dell'omento si osservano in maggior copia elementi cellulari, contenenti o no germi e bacilli capsulati liberi.

Cavia 11. 350 gm.. muore nella notte.

Reperto. L'essudato è ricchissimo di bacilli capsulati. I bacilli sono quasi senza eccezione liberi, quantunque siano presenti numerosi leucociti.

Nei preparati eseguiti con fucsina carbolica $^1/_{30}$ si osservano soltanto poche forme degenerate. In tutti gli organi si riscontrano numerosi bacilli.

Cavia 12. 420 gm., muore nella notte.

Si distingue dall'animale precedente solo perchè si vedono pochi leucociti nell essudato.

Se poi si tratta d'iniezioni di spore (1/6 di cultura su agar tenuta 6 giorni a 37°) i fatti più salienti che si osservano, si faccia o no contemparanea iniezione di carminio (i risultati rimangono identici) consistono in una più ricca fagocitosi in primo tempo, e nella comparsa, dopo 8 ore circa, di piccoli bacilli, che si sviluppano in progressione crescente, nonostante una intensissima leucocitosi, la quale si mantiene costante dalle 6 o 7 ore dopo l'iniezione, fino alla morte, che ordinariamente avviene dopo 15 ore o poco più. Anche in tal caso si osserva fagocitosi, se si fa un preparato dall'omento dopo la morte dell'animale.

E che poi lo sviluppo dei germi sia da attribuirsi a spore fagocitate, ma sopravvissute alla distruzione per opera dei leucociti, viene

dimostrato dal fatto che talora dell'essudato peritoneale, 4-5 ore dopo l'iniezione, vi è tale scarsezza di germi, che, conservando in termostato un preparato in goccia pendente fatto in quel tempo, si può, al giorno successivo, non osservare nessun sviluppo.

Mentre invece, facendo preparati dal liquido peritoneale alquanto più tardi, i germi cominciano a comparire in quantità sempre maggiore, ed i preparati tenuti allo stesso modo in termostato, dimostrano uno sviluppo ricchissimo.

Spore del carbonchio (ottenute su agar, tenendo la cultura 6 giorni in termostato) $^1/_6$ di cultura i. p. senza carminio.

Cavia 13. Uccisa dopo 30'.

Nessun bacillo nel liquido peritoneale, leucociti piuttosto numerosi. Fagocitosi di spore.

Gli stessi fatti si osservano sull'omento.

Cavia 14. Uccisa dopo 12 ore.

Nessun bacillo nel liquido peritoneale, molti leucociti.

Cavia 15. Uccisa dopo 8 ore.

Nel liquido peritoneale si osservano moltissimi leucociti, in gran parte polinucleari; discretamente numerosi sono anche i linfociti.

Sull'omento si notano spore e corti bacilli, con scarsa fagocitosi.

Cavia 16. Muore dopo 11 ore.

Nel liquido peritoneale molti leucociti, bacilli corti, scarsa fagocitosi.

Cavia 17. Uccisa dopo 13 ore.

Nel liquido peritoneale moltissimi leucociti, pochi bacilli corti, scarsa fagocitosi.

Sull'omento si osservano spore nell'interno dei leucociti e delle cellule endotelioidi. Pochi bacilli quasi tutti liberi. Leucocitosi.

Cavia 18. Muore dopo 15 ore.

Nel liquido peritoneale si osservano molti bacilli, leucociti in discreto numero.

Spore del carbonchio (ottenute mantenendo 6 giorni in termostato una cultura in agar) $^1/_6$ di cultura i. p. + 1 cmc. di emulsione di carminio.

Cavia 19. Uccisa dopo ore 1.30.

Omento con l'ordinario reperto di ammassi di grosse cellule mononucleari e di leucociti. A causa dei granuli di carminio non si possono differenziare le spore. Scarsi bacilli ben colorati, liberi tra le cellule. Liquido peritoneale discretamente ricco di leucociti.

Gocce pendenti fatte dal liquido peritoneale 10' dopo l'iniezione e messe in termostato, non mostrano alcuno sviluppo al giorno seguente.

CAVIA 20. Uccisa dopo 8 ore.

Numerosi ammassi di leucociti nel liquido peritoneale e sull'omento. Nessun bacillo e nessuno sviluppo dalle gocce pendenti.

CAVIA 21. Uccisa dopo 5 ore.

Dopo 30 minuti. Alcuni corpuscoli rossi, pochi leucociti, alcune spore rigonfiate.

Dopo 1 ora. Lo stesso che dopo 30′.

Dopo 2 ore. Molti leucociti.

Dopo 5 ore viene uccisa. Nei preparati del liquido peritoneale molti leucociti, nessun bacillo. I preparati fatti dopo 30 minuti primi, 1 ora, 2 ore, i quali non mostravano nessun bacillo, messi in termostato, presentano al mattino successivo sviluppo di germi. I preparati fatti dopo 5 ore invece, non mostrano nessun sviluppo.

Omento. Colorato con fucsina carbolica 24 ore, lavato in alcool e colorato di nuovo con bleu di metilene, lascia vedere ammassi di leucociti, quasi tutti polinucleari. Alcuni di questi presentano spore fagocitate.

CAVIA 24. Muore al mattino seguente.

Dopo 30′ fino a dopo 5 ore, il reperto è uguale a quello dell'animale precedente.

Dopo 8 ore. Molti leucociti e pochi bacilli. I preparati fatti dopo 30 minuti primi, 1 ora, 2 ore, che apparentemente erano privi di germi, messi in termostato, mostrano al giorno successivo un ricco sviluppo.

Se si esaminano gli organi degli animali morti, sia che si tratti di infezione con bacilli virulenti, sia che si tratti di spore, si trovano sempre quantità enormi di bacilli, con grande distruzione degli elementi propri dell'organo e dei leucociti, in modo che non si può sicuramente dire se ed in che grado, si manifesti la fagocitosi.

Colera asiatico (Baku).

Le esperienze in serie in cavie approssimativamente dello stesso peso (250-300 gm.) dimostrarono che iniettando una dose molte volte mortale (1/20 di cultura in agar) si ha sulle prime diminuzione di germi, che si lasciano mal colorare, ed in parte appaiono trasformati in granuli (già dopo 20′).

Si ha molta fagocitosi da parte dei fagociti mononucleari (già dopo 20′), la quale si osserva per tutto il decorso dell'infezione fino alla morte, che avviene ordinariamente dopo 7-9 ore. Si può specialmente ben osservare nei preparati dell'omento. Non è raro osservare degli ammassi di germi ben colorati nell'interno di leucociti, che appaiono in via di dissoluzione: evidentemente si tratta di vibrioni, che *si sono moltiplicati nell'interno degli elementi cellulari*.

Dopo 2 ore ordinariamente si ha aumento di germi, aumento che è successivo alla rapida diminuzione osservata poco dopo l'iniezione, ed andando oltre, dopo 5-7 ore, irregolarmente diminuzione ed aumento, che però *quasi mai sorpassa molto la quantità dei germi iniettati*. Infatti se calcoliamo il numero dei vibrioni viventi contenuti nell'essudato libero, abbiamo al momento della morte una cifra di un miliardo o tutt'al più un miliardo e mezzo; in tutti i restanti organi solo alcuni milioni; se calcoliamo la quantità iniettata, questa arriva circa ad un miliardo di germi.

I granuli batterici, sia all'esterno che all'interno degli elementi cellulari, sono in generale un poco più numerosi da principio, diminuendo fino ad un certo punto all'acme dell'infezione; però non si presentano in rapporto costante colla diminuzione dei germi; e mentre non eccessivamente numerosi sono d'ordinario quelli che si trovano al difuori delle cellule, non è raro di trovarne un numero relativamente grande in date isole dell'omento, ed in dati periodi dell'infezione, che non si succedono con costanza neanche relativa. Però nel momento della morte in generale si osservano numerosi accumuli di leucociti sull'omento.

Alla fagocitosi che talvolta è intensa, prendono spesso parte anche le cellule endoteliali e le cellule del connettivo, senza però che a questi elementi possa attribuirsi un'azione preponderante.

Quanta poi alla quantità di leucociti nell'essudato libero, questi nelle prime ore si mantengono presso alla norma, ma poi tendono a diminuire progressivamente a misura che l'infezione progredisce, dimodochè prima dell'esito letale sono presenti in scarsissimo numero.

Colera virulento (Baku). Cavie 250-270 ricevono $^{1}/_{20}$ di cultura in agar i. p.

Cavia 1. Uccisa dopo 20′.

Nel liquido peritoneale si vedono moltissimi bacilli in gran parte mal colorati, e pochi leucociti,

Scarsi granuli, bene colorati.

Omento. Molti bacilli, leucocitosi poco pronunziata. Parecchi bacilli fagocitati. Trasformazione di bacilli in granuli nell'interno dei leucociti.

Piastre.

Liquido peritoneale 60 milioni (1 cc.).
Sangue 28,000 (1 cc.).
Fegato 7000 (1 gm.).
Rene 4500 (1 gm.).
Milza 22,000 (1 gm.).
Polmone scarsi.

Cavia 2. Uccisa dopo 2 ore.

Reperto. Liquido peritoneale con molti bacilli in gran parte agglutinati, e parecchi leucociti ammassati in accumuli. Manifesto aumento di germi, che sono anche ben colorati. Negli organi pochi bacilli e nel sangue relativamente molti, ma con molte forme alterate.

Omento. Molti bacilli, leucocitosi, fagocitosi esercitata soltanto dai leucociti, che in massima parte sono riuniti in ammassi. I leucociti che contengono molti bacilli sembrano profondamente alterati. Trasformazione dei bacilli in granuli sia nell'interno che all'esterno degli elementi cellulari. Si vedono nell'interno delle cellule bacilli che sembrano in via di sviluppo.

Piastre.

Liquido peritoneale 375 milioni (1 cc.).
Sangue 1 milione (1 cc.).
Fegato 10,500 (1 gm.).
Rene 75,000 (1 gm.).
Milza 105,000 (1 gm.).
Polmone 8000 (1 gm.).

Cavia 3. Uccisa dopo 5 ore.

Reperto. Nell'essudato molti bacilli agglutinati, discreto numero di leucociti, che in massima parte formano ammassi. Quasi nessun granulo

Negli organi e nel sangue pochi bacilli.

Omento (Come nell'animale 2).

Piastre.

Liquido peritoneale 90 milioni (1 cc.).
Sangue 3500 (1 cc.).
Fegato 18,000 (1 gm.).
Rene 60,000 (1 gm.).
Milza 45,000 (1 gm.).
Polmone scarsi.

Cavia 4. Morta dopo 7 ore.

Reperto. Essudato con molti bacilli non agglutinati, e molto scarsi leucociti.

Negli organi e nel sangue pochissimi bacilli quasi tutti liberi.

Omento. Moltissimi bacilli liberi. Ammassi di leucociti in parte pieni di bacilli. Notevole fagocitosi. Alcuni elementi cellulari più o meno rotondeggianti, che accompagnano i capillari, prendono parte alla facogitosi. In molti punti aumento di germi nell'interno dei fagociti.

Piastre.

Liquido peritoneale 450 milioni (1 cc.).
Sangue 450,000 (1 cc.).
Fegato 500,000 (1 gm.).
Rene 50.000 (1 gm.).
Milza 600,000 (1 gm.).
Polmone 1 $^1/_2$ milioni.

CAVIA 5. Morta dopo 9 ore e 30.

Reperto. Essudato contenente un numero straordinario di germi non agglutinati, e scarsi leucociti.

Negli organi scarsissimi germi, pochi nel sangue.

Omento (Come nell'animale 4). Molti bacilli liberi, in molti punti molti granuli ben colorati. Questi punti non sono molto ricchi di cellule. In altri luoghi si trovano molti vibrioni ben colorati.

Piastre.

Liquido peritoneale 400 milioni (1 cc.).
Sangue 3 milioni (1 cc.),
Fegato 17,500 (1 gm.).
Rene 12,500 (1 gm.)
Milza 75,000 (1 gm.).
Polmone 42,000 (1 gm.).

CAVIA 6. Morta dopo 7 ore, viene sezionata al mattino seguente.

Reperto. Nell'essudato molti grossi vibrioni. Scarsissimi nel sangue.

Omento. In paragone dei preparati precedenti i germi non sono così numerosi. In quanto al resto non si ha differenza.

Piastre.

Liquido peritoneale 300 milioni (1 cc.).
Sangue 100 (1 cc.).
Fegato 30,000 (1 gm.).
Rene 120,000 (1 gm.).
Milza 90,000 (1 gm.).
Polmone 40,000 (1 gm.).

CAVIA 7. Uccisa dopo 5 ore.

Reperto. Nel liquido peritoneale moltissimi germi in parte agglutinati e nel massimo numero mal colorati. Non si vedono quasi leucociti; granuli batterici in scarsa quantità; parecchi corpuscoli rossi.

Omento. Molti bacilli male colorati, in massima parte fuori dei leucociti. I leucociti formano grossi ammassi, ripieni di granuli batterici, granuli che in parte sono bene colorabili, in parte no. Negli ammassi si osservano nuclei di leucociti polinucleari che sono divenuti liberi. Molti granuli mal colorati anche all'esterno degli elementi cellulari. Le cellule endotediali sembrano non partecipare alla fagocitosi.

Da questo animale si estraggono 3 cc. di liquido peritoneale. Un cc. viene iniettato nel peritoneo di ciascuno di due nuovi animali (V. cavie n. 8 e 9).

Esperienze con bacilli ricavati dall'animale ucciso dopo 5 ore (cavia n. 7) dall'iniezione di $^1/_{10}$ di cultura i. p.

CAVIA 8. 270 gm. riceve 1 cc. di essudato peritoneale della cavia n. 7. Viene uccisa dopo 40'.

Reperto. Nell'essudato peritoneale molti vibrioni in parte agglutinati. Granuli in mediocre quantità rispetto al numero dei germi, ma molto più in confronto coll'animale precedente. Non si vedono leucociti.

Omento. Ammassi di leucociti, dei quali *molti sono ripieni di granuli batterici.* Vibrioni veri e propri non si vedono nell'interno delle cellule. Esistono granuli anche extracellulari. I bacilli liberi, in parte bene, in parte mal colorati, sono relativamente in minor numero rispetto ai granuli.

Piastre.

Liquido peritoneale, 1 piccola ansa ∞.
Sangue 12,000 (1 cc.).
Polmone 200 (1 gm).

Cavia 9. Un'altra cavia iniettata colla stessa dose (1 cc. di essudato della cavia 7) vive sino al mattino successivo. Uccisa, non presenta germi nel peritoneo. Questo ci fa credere come anche la cavia precedente (8) avrebbe con tutta verosimiglianza vinta spontaneamente l'infezione.

Risulta dunque, che nell'infezione con una dose molte volte letale, non mancano i segni di una lotta tra le forze dell'organismo da una parte, i batteri dall'altra. Le prime sono rappresentate dai *fagociti* fissi e mobili del peritoneo, e dal *siero peritoneale*, che riduce in granuli molti dei germi iniettati, e forse ancora ne distrugge un'altra parte, in modo men facilmente apprezzabile. I vibrioni che sopravvivono a tale distruzione si moltiplicano, ma apparentemente non in grado considerevole.

In queste infezioni gravissime, la distruzione batterica non si compie solo nel primo tempo dopo l'iniezione, ma anche nelle ore più avanzate, sotto l'influenza della sopravvenuta infiammazione, e cioè dell'essudato liquido e cellulare; è molto difficile d'indicare chiaramente l'importanza di questo fattore, che sembra molto variabile, ma non del tutto trascurabile, come dimostra l'esempio della cavia 9.

Benchè sia certo che la morte avviene sempre per intossicazione, non si può con altrettanta certezza affermare, se essa dipenda solo da *endotossina*, uscita dai cadaveri dei germi, come vuole lo Pfeiffer, o se anche i vibrioni *viventi* non producano dei veleni. Anzi, considerando il numero dei batteri distrutti durante l'infezione, questa seconda ipotesi ci sembra la più probabile. Non che tal numero sia di per sè scarso, ma, ove si consideri che sono necessari parecchi miliardi di vibrioni morti per uccidere in breve tempo una cavia, esso appare verosimilmente insufficiente a fornire nel corpo dell'animale tanta endotossina capace di determinare la morte così rapida.

Il nostro metodo ci permetteva di giudicare con sufficiente esattezza della importanza dell'infezione generale. Dalle cifre degli esperimenti sopra riportati risulta che il sangue e gli organi contengono

una quantità variabile di germi; ma *non si può mai dire che si sia avuta una vera setticemia,* poichè il calcolo ci mostra tutt'al più 1-3 milioni in 1 cmc. di sangue, e $^1/_2$-1 $^1/_2$ milioni in un grammo degli organi (fegato, milza e polmone), cifre minime come ben si vede, in confronto all'enorme quantità contenuta nel peritoneo.

Quanto all'origine dei germi del sangue, non c'è dubbio che siano assorbiti fin dal primo momento dell'infezione, seguendo dalla cavità peritoneale la via attraverso il centro tendineo del diaframma, ben conosciuta per le ormai ben note e vecchie esperienze di von Rechklinghausen. Se durante tutta l'infezione questo assorbimento continua, è difficile a dirsi, nè abbiamo trovato una regola nella quantità dei germi contenuti nel sangue (V. gli esperimenti) La stessa irregolarità si osserva quando si paragona il contenuto batterico degli organi e del sangue. In alcuni casi infatti i vibrioni erano molto più abbondanti negli organi che non nel sangue, ciò che probabilmente significa esservi una ragione per cui essi sono ritenuti nei capillari (fagocitosi); mentre può spiegarsi la superiorità numerica del sangue, osservata in altri casi, per la mancanza di una fagocitosi considerevole nell'interno degli organi.

Comunque sia, riteniamo che nel colera sperimentale della cavia, l'infezione generale ha un'importanza quasi trascurabile.

Iniettando $^1/_{100}$ di cultura, si ha quasi di regola diminuzione di germi, spesso con curve di successivi elevamenti e diminuzioni. Anche la mobilità dei germi va diminuendo, mentre per ciò che concerne *i* granuli liberi, questi, che non sono mai in quantità neanche mediocre, subiscono oscillazioni quantitative circa il loro presentarsi.

Il numero dei leucociti è, in generale, maggiore che nella iniezione di $^1/_{20}$, e la fagocitosi se non più intensa, appare almeno più manifesta. Pur tuttavia, e nonostante la diminuzione grande dei germi rispetto alla quantità iniettata, e l'accorrere di molti leucociti dopo 6-7 ore, l'animale muore ordinariamente dopo 7-9 ore. Nuova prova che la teoria dell'endotossina non corrisponde ai fatti!

Colera Baku.
Cavie iniettate i. p. con $^1/_{100}$ di cultura in agar.

Cavia 10. 280 gm., uccisa dopo 4 ore.

Dopo 10 ore molti bacilli vivacemente mobili, globuli rossi e leucociti in ammassi.

Dopo 40' molto bacilli mobilissimi, alcuni leucociti, in parte in ammassi.

Dopo 60' moltissimi bacilli, in grandissima parte mobili.

Dopo 2 ore pochi bacilli mobili, la maggior parte immobili. Leucociti discretamente numerosi in ammassi.

Dopo 3 ore pochi bacilli mobili, pochi leucociti, pochi granuli.

Dopo 4 ore pochi leucociti, pochi bacilli.

Piastre (contenuto di germi in un'ansa).

Dopo 1 ora 60,000.
» *2 ore* 46,500.
» *3 ore* 45 000.
» *4 ore* 4.500.

Le gocce pendenti coltivate in termostato, mostrano:

1) quelle del primo tempo; non agglutinazione, notevole aumento.

2) da un'ora in poi agglutinazione, aumento sempre, ma insieme qualche granulo.

Cavia 11. 270 gm., muore dopo 9 ore.

Dopo 30' molti bacilli mobili, la maggior parte però immobili, non agglutinati, pochi leucociti.

Dopo 60' moltissimi bacilli, in gran maggioranza immobili, non leucociti.

Dopo 2 ore pochi bacilli mobili, la massima parte immobili, leucociti discretamente numerosi, in parte in ammassi.

Dopo 3 ore pochi bacilli mobili, pochi leucociti.

Dopo 5 ore pochi bacilli mobili, leucociti piuttosto aumentati.

Dopo 6 ore leucociti discretamente numerosi, in parte in ammassi, pochi bacilli mobili, molti immobili.

Dopo 7 ore molti leucociti, pochi bacilli, mobili, in generale essi sembrano molto diminuiti.

Piastre.

Dopo 1 ora 60,000.
» *2 ore* 345.000.
» *3 ore* 37,500.
» *4 ore* —
» *5 ore* 300,000.
» *6 ore* 300,000.
» *7 ore* 12,000.

Cavia 12. 220 gm., muore nella notte.

Dopo 5 ore, il reperto è uguale a quello dell'animale 2.

Cavia 13. 290 gm., muore nella notte.

Dopo 5 ore il reperto è uguale a quello dell'animale 2.

Dopo 10 ore discreto numero di bacilli mobili, pochi bacilli in parte in piccoli ammassi.

Cavie iniettate i. p. con $^1/_{200}$ di cultura in agar.

Cavia 14. 220 grm., uccisa dopo 2 ore.

Reperto. Nel liquido peritoneale molti bacilli, in parte agglutinati, pochi leucociti, qua e là alcuni granuli batterici.

Omento. Leucocitosi e fagocitosi. Molti granuli all'esterno ed all'interno dei leucociti, in parte bene, in parte debolmente colorati. Bacilli veri e propri sono nella massima parte all'esterno dei leucociti e ben colorati; pochi se ne vedono assorbiti dalle cellule. Grosse cellule mononucleari partecipano alla fagocitosi.

Piastre.

Sangue 36,000 (1 cc.).
Liquido peritoneale ∞.
Polmone 40,000 (1 grm.)

CAVIA 15. 240 grm., muore dopo 12 ore.

Reperto. Nel liquido peritoneale gran numero di bacilli in parte agglutinati. Molti bacilli mal colorati, discreta quantità di granuli, pochi leucociti. I bacilli non agglutinati sembrano meglio colorati che gli agglutinati.

Omento. L'animale non viene sezionato fino al giorno successivo.

Piastre.

Essudato peritoneale 200 milioni (1 cc.).
Polmone 840,000 (1 grm.)
Sangue 825,000 (1 cc.).

Iniettando $^1/_{300}$, $^1/_{350}$, $^1/_{400}$ di una cultura in agar i germi o vanno progressivamente scomparendo, o si mostrano in numero relativamente non molto variabile fino ad alcune ore (7-8) dopo l'iniezione per diminuire in seguito. Di pari passo colla scomparsa dei vibrioni, si nota l'accorrere di leucociti nell'essudato libero; i granuli liberi che si osservano nei preparati dell'essudato, non sono in proporzione colla diminuzione dei germi, cosicchè si è indotti a credere che vi sia ancora un altro mezzo, con cui essi vengono distrutti. Che la fagocitosi partecipi è ben sicuro, ma non sembra che essa abbia la prevalenza. I pochi vibrioni che si osservano in ultimo, quando vi è notevole leucocitosi, sono debolmente colorati.

Colera — Cavie, iniezione i. p. $^1/_{300}$-$^1/_{400}$.

CAVIA 16. 240 gm., riceve $^1/_{300}$ di cultura in agar.

Dopo 15' bacilli discretamente numerosi, pochi leucociti. Numerosi bacilli scolorati al centro e colorati ai poli. Alcuni granuli batterici.

Dopo 45' bacilli molto aumentati di numero, molto ben colorati, e con essi molte forme degenerate. Granuli discretamente numerosi. Molti leucociti in gran parte in ammassi, solo pochi contengono granuli batterici.

Dopo 1 ora 45' molti bacilli, forme degenerate sempre presenti. Parecchi granuli batterici, molti leucociti. Aumentato il numero dei leucociti contenenti granuli.

Dopo 4 ore il preparato colorato mostra molti precipitati. Il numero dei germi sembra piuttosto diminuito. Pochi leucociti, tra cui pochissimi fagociti.

Dopo 6 ore il numero dei bacilli è come dopo 4 ore. Pochissimi granuli, molti leucociti con assai fagociti.

Dopo 7 ore molti leucociti in ammassi. Il numero dei bacilli all'incirca come dopo 6 ore. Granuli scarsi.

Dopo 9 ore moltissimi leucociti, pochi bacilli, pochissimi granuli.

Piastre (un'ansa di 2 mgm.).

Dopo ..... *15'*	12,000.
» ..... *45'*	21,000.
» *1 ora 45'*	60,000.
» *4 ore* ...	9,000.
» *6* » ...	15,000.
» *7* » ...	45,000.
» *9* » ...	15,000.

Nelle gocce pendenti conservate in termostato 2 ore, ed utilizzate quindi per la colorazione e l'osservazione dei microrganismi, si vede in parte un leggero aumento di germi, ma prevale l'aumento dei granuli, e, dove esistono leucociti, la fagocitosi.

CAVIA 17. 240 gm., riceve $^1/_{350}$ di cultura in agar.

Dopo 15' bacilli discretamente numerosi tutti ben colorati. Granuli ben colorati, liberi. Pochi leucociti, scarsa fagocitosi.

Dopo 45' come dopo 15'.

Dopo 1 ora 45' leucociti e bacilli aumentati di numero; granuli discretamente numerosi, in parte fagocitati.

Dopo 4 ore i bacilli sembrano diminuiti; molti sono debolmente colorati, in parte anche agglutinati. Granuli non numerosi e male colorati Molti leucociti.

Dopo 6 ore come dopo 4 ore. Diminuito il numero dei bacilli.

Dopo 7 ore bacilli scarsi, molti leucociti, granuli mal colorati.

Dopo 9 ore moltissimi leucociti, pochi germi.

Piastre (un'ansa di 2 mgm.).

Dopo ..... *15'*	24,000.
» ..... *45'*	10,000
» *1 ora 45'*	1,500.
» *4 ore* ...	500.
» *6* » ...	2,200.
» *7* » ...	0.
» *9* » ...	100.

CAVIA 18. 245 gm., riceve $^1/_{400}$ di cultura in agar.

Dopo 15' bacilli discretamente numerosi quasi tutti ben colorati; molti però mostrano uno spazio chiaro al centro. Pochi leucociti, pochi granuli liberi. Fagocitosi assente.

Dopo 45' il numero dei germi è molto aumentato; molti sono male colorati; esistono abbondanti granuli. Molti leucociti contengono granuli batterici.

Dopo 1 ora 45' come dopo 45' il numero dei granuli è alquanto diminuito.

Dopo 4 ore precipitati nei preparati colorati; i bacilli sembrano diminuiti. Leucociti in mediocre numero, alquanto granuli, fagocitosi di granuli.

Dopo 6 ore come dopo 4 ore. Pochissimi fagociti.

Dopo 7 ore ricca leucocitosi, pochi bacilli quasi tutti mal colorati. Granuli come dopo 6 ore.

Dopo 9 ore moltissimi leucociti; pochi bacilli mal colorati.

Piastre (un'ansa di 2 mgm.).

Dopo ..... *15'*	24,000.
» ..... *45'*	12,000.
» *1 ora 45'*	1,500.
» *4 ore* ...	1,500.
» *6* » ...	1,000.
» 7 » ...	—
» *9* » ...	150.

Iniettando $^1/_{400}$ e $^1/_{500}$, se si fanno osservazioni comparative, uccidendo l'animale dopo 20'-30' e dopo 2 ore, si osservano ordinariamente gli stessi fatti. Nell'essudato peritoneale il contenuto dei germi può essere press'a poco eguale, nel sangue e negli altri organi esso è egualmente scarso. Talvolta nella prima mezz'ora dopo l'iniezione si possono trovare scarsi leucociti e scarsissima fagocitosi con fatti degenerativi dei bacilli, come rigonfiamento degli stessi, assottigliamento, debole colorazione, presenza di granuli agli estremi ben colorati, mentre nel mezzo il bacillo è debolmente colorato, presenza di una specie di capsula al luogo del vibrione. Più tardi però, vi è con maggior costanza leucocitosi e fagocitosi, nonostante che i germi dell'essudato libero mostrino talvolta dei segni evidenti di degenerazione, come sopra si è detto.

Colera.

Cavie — Iniezione i. p. di $^1/_{400}$ di cultura in agar in 1 cc. di brodo.

Cavia 19. 215 grm., uccisa dopo 20'.

Reperto. Vibrioni piuttosto numerosi nell'essudato, quasi tutti liberi; molti di essi si mostrano scolorati nel centro e colorati agli estremi. Contemporaneamente si vedono vibrioni ben colorati *in toto*, e vibrioni *in toto* mal colorati. Pochi leucociti, non fagocitosi. Preparato del sangue mostrano scarsi leucociti, per lo più rappresentati da linfociti.

Omento. Non vi è traccia di leucocitosi, non sono molti i bacilli ben colorati *in toto*. Il numero complessivo dei germi è piccolo, essendo i più scolorati nel centro, altre volte ad un'estremità; anche se ne vedono di pallidi e rigonfiati. Qua e là granuli bene e male colorati. Alcuni vibrioni appaiono, come se fossero unicamente costituiti da una capsula.

Piastre.

Liquido peritoneale, 7 ½ milioni in 1 cc.
Sangue, 600 in 1 cc.
Polmone, 180 in 1 grm.
Le gocce pendenti, conservate in termostato, mostrano sviluppo.

CAVIA 20. 210 grm., uccisa dopo 2 ore.

Reperto. Molti leucociti quasi tutti polinucleari in gran parte in ammassi. Bacilli aumentati in confronto al primo animale. Scarsa fagocitosi. Oltre a bacilli ben colorati ve ne sono alcuni che mostrano come un vacuolo nella parte centrale. Vi sono diverse gradazioni di granuli ben colorati, mediocremente colorati e mal colorati. Anche la loro grandezza è diversa, ed in generale i più grandi sono colorati peggio.

Omento. Ammassi di leucociti polinucleari, bacilli piuttosto rari. Vi sono bacilli bene e mal colorati. Granuli discretamente numerosi, in massima parte mal colorati. Gli ammassi di leucociti si estendono anche lungo i vasi.

Piastre.

Liquido peritoneale, 10 milioni in 1 cc.
Sangue, 3000 in 1 cc.
Polmone, 500 in 1 grm.
Le gocce pendenti, conservate in termostato, mostrano sviluppo.

CAVIA 21. 220 grm., resta in vita.

Dopo 4, 5, 7 ore si vede che il numero dei leucociti aumenta.

Di bacilli non se ne vedono che scarsissimi, essendo la maggior parte già stati distrutti dopo 4 ore.

I preparati in goccia pendente, conservati in termostato, non mostrano sviluppo alcuno.

Colera. Cavie iniezione i. p. di $^1/_{400}$ di cultura in agar.

CAVIA 22. 210 gm. Riceve l'iniezione in 0,1 cmc. di brodo.

Dopo 15' bacilli discretamente numerosi (quasi tutti mal colorati) molto mobili, leucociti in grossi ammassi. Fagocitosi assente.

Dopo 45' come dopo 15'. Granuli discretamente numerosi, molti leucociti, fagocitosi assente.

Dopo ore 1.15 molti leucociti, i bacilli come dopo 45'. pochi granuli liberi.

Dopo ore 1.45 i bacilli mobili diminuiscono, aumentano i granuli, molti leucociti, scarsa fogocitosi di granuli.

Dopo ore 2.15 progressiva diminuzione dei bacilli. Discreto numero di granuli, molti leucociti.

Dopo ore 2.45 bacilli mobili straordinariamente scarsi, aumentato il numero dei granuli e dei leucociti. Esiste fagocitosi di granuli.

Dopo ore 3.15 ricca leucocitosi, proporzionalmente molti granuli. Non si vedono più bacilli mobili. Aumento della fagocitosi dei granuli.

Dopo ore 3.45 granuli piuttosto numerosi, rarissimi bacilli.
Dopo 6 ore scarso essudato, ammassi di leucociti.

Piastre (un'ansa del liquido peritoneale).

Dopo 15' 15,000.
» *45'* 16,500.
» *ore 1.15* 9000.
» *ore 2.15* 1000.
» *ore 3.15* 4500.
» *ore 4* 425.
» *ore 6* 900.

I preparati in goccia pendente mantenuti in termostato, mostrano da ore 2.15 in poi assenza di sviluppo ed aumento di fagocitosi.

CAVIA 25. 210 gm. Riceve l'iniezione di $^1/_{400}$ di cultura in agar in 1 cmc. di brodo.

Dopo 15' bacilli discretamente numerosi, pochi leucociti.

Dopo 40' bacilli come sopra. Si vedono alcuni granuli liberi, rari leucociti.

Dopo ore 1.35 bacilli aumentati; essi sono in buona parte ben colorati. Granuli in proporzione piuttosto rari. Leucociti aumentati.

Dopo 3 ore bacilli notevolmente aumentati, moltissimi agglutinati; aumentato pure il numero di granuli. Molti leucociti in parte in ammassi. Ricca fagocitosi di granuli.

Dopo 6 ore molti bacilli, in gran parte agglutinati e molto mal colorati.

Muore dopo 2 giorni. senza mostrar germi nell'essudato: ricca leucocitosi, molti macrofagi.

Omento. Ricca leucocitosi; non si vedono granuli, solo qua e là qualche bacillo mal colorato.

Piastre (un'ansa del liquido peritoneale).

Dopo 15' 15,000.
» *40'* 16,500.
» *ore 1.30* 37,000.
» *ore 3* 150,000.
» *ore 6* 22,000.

CAVIA 24. 230 gr. Riceve $^1/_{500}$ di cultura in agar i. p. in 0.1 cmc. di brodo.

Dopo 30' nell'essudato si vedono bacilli discretamente numerosi e leucociti pure in discreto numero. Fagocitosi assente.

Dopo ore 1.30 bacilli e leucociti come dopo 30'; pochi granuli, scarsa fagocitosi di essi.

Dopo ore 2.30 molti leucociti, bacilli diminuiti, granuli forse più numerosi; maggiore la fagocitosi di essi.

Dopo ore 3.30 leucociti sempre crescenti di numero, bacilli molto scarsi e mal colorati.

Dopo ore 4.30 sempre più leucociti e germi rarissimi.

Piastre (un'ansa di essudato peritoneale).

Dopo 30' 30,000.
» *ore 1.30* 12,000.
» *ore 2.30* 3000.
» *ore 3.30* 1000.
» *ore 4.30* 50.

L'efficacia della fagocitosi è dimostrata dagli ammassi di granuli batterici nell'interno dei leucociti. Paragonando però lo scarso numero dei vibrioni, trovati viventi per mezzo delle culture, colla quantità iniettata, si deve concedere che alcune volte non si trova una ragione capace di spiegare una sì rapida scomparsa. Per esempio, nella cavia n. 19 sembra mancare un'estesa fagocitosi, e nello stesso tempo non si trovano che poche forme degenerate. E' possibile che in 20' la distruzione sia stata così rapida e completa? Anche nella dissenteria abbiamo osservato simili fatti che crediamo di potere escludere, esser dovuti ad un errore di esperimento; piuttosto possiamo invocare le *differenze individuali degli animali*, così notevoli in alcuni casi. Si vedano, per esempio, gli animali 22 e 23, inoculati colla stessa quantità di germi ($^1/_{400}$); in essi è vero che la quantità del brodo che serviva come mezzo di sospensione dei batteri era nell'un caso più grande che nell'altro; ma non possiamo solamente con ciò spiegare l'enorme differenza del reperto peritoneale.

Per il vibrione del colera, come per il bacillo della dissenteria, istituimmo delle ricerche *in vitro*. Per esaminare le proprietà antibatteriche dell'essudato peritoneale in vari periodi dell'infezione, abbiamo conservato in stufa le gocce pendenti fatte coll'essudato stesso, e le abbiamo studiate come tali, ed in preparato, dopo 1-24 ore. Il risultato ci ha permesso di stabilire che nelle infezioni gravi ($^1/_{100}$) i vibrioni *si sviluppavano quasi sempre bene per tutta la durata dell'infezione;* con ciò però, qualche granulo si formava, ed i vibrioni, mobili e liberi al momento dell'iniezione, si agglutinavano costantemente (nei preparati in goccia pendente del l. peritoneale estratto col capillare). Nelle infezioni più leggere ($^1/_{200}$, $^1/_{400}$) lo sviluppo aveva luogo solo nelle prime ore; più tardi quando il contenuto batterico era diminuito e la leucocitosi abbastanza pronunziata, allora notevole compariva la trasformazione dei germi in granuli, in parte liberi, in parte nell'interno dei leucociti.

Inoltre cercammo di stabilire un confronto tra il potere batteriolitico del liquido peritoneale con quello del siero di sangue della stessa cavia, e ciò tanto nell'animale normale, quanto in quello immunizzato.

Le cavie immunizzate per via peritoneale, cominciavano a ricevere nel peritoneo $^1/_{600}$ di cultura in agar, e quindi venivano successivamente iniettate per lo spazio di circa due mesi con dosi sempre crescenti fino ad $^1/_5$ di cultura. Alcuni animali con questo trattamento morivano, specialmente dopo l'ultima iniezione, nonostante avvessero bene sopportato le precedenti; la maggior parte però vivevano senza presentare diminuzione di peso, nè altro segno di malattia.

Il liquido peritoneale si estraeva nello stesso giorno in cui si allestivano gli esperimenti, cercando di ottenerne per mezzo di una pipetta capillare la maggior quantità possibile. Il liquido estratto veniva portato in piccole provettine paraffinate, e subito centrifugato. Separata la parte liquida sovrastante, che veniva posta in altra piccola provetta a parte, il sedimento era alternativamente esposto alla temperatura del termostato (37°) e di un miscuglio frigorifero fatto di ghiaccio e sal di cucina, in modo da dissolvere, per così dire, i leucociti, ed estrarne la sostanza attiva.

Naturalmente, data la scarsità del liquido, non si potè fare una gran serie di prove per ogni esperimento, ma sempre abbastanza per essere autorizzati a trarne delle deduzioni comparative. Per la stessa ragione, tali prove battericide non poterono essere eseguite in tubi da saggio, ma dovemmo ricorrere alle gocce pendenti, un metodo del resto che si prestava assai bene.

La quantità di germi aggiunta (sebbene non sempre costante) era in generale piccola, come è indicato nelle tabelle; solo in alcuni casi, per eseguire dei confronti, venivano fatti innesti più copiosi.

Si comprende che tutta la tecnica era intesa a porsi al riparo di possibili inquinamenti; e quindi sterili erano i vetrini, porta e coprioggetti, la vaselina ecc. I preparati così allestiti venivano mantenuti due ore o più in termostato a 37°: e dopo, da ciascuno di essi si faceva una piastra, utilizzando per ciò tutto la goccia pendente. Dopo aver sollevato il vetrino, la goccia veniva mescolata con una grossa ansa di acqua distillata (il cui uso, come vedremo in ulteriori esperienze, aveva per scopo di disciogliere gli accumuli dei leucociti esistenti nel preparato), e poi, mentre con una pinzetta veniva tenuto livemente inclinato il vetrino, coll'altra mano si versava su di esso il tubo di agar mantenuto a 40°-45°, in modo che l'agar trascinasse con se tutto il materiale che vi si trovava.

Ogni volta non trascuravamo di eseguire dovuti controlli, e, quando il liquido era sufficiente, si facevano anche gocce pendenti, che poi servivano per preparati colorati. Negli esperimenti in cui la scarzezza del liquido, non permetteva questa doppia serie di ricerche comparative, le gocce pendenti venivano prima osservato al microscopio, e successivamente servivano per l'allestimento delle piastre.

Dalle nostre numerose esperienze risultò, che il siero di sangue normale di cavia, se si fanno relativamente grossi innesti di emulsione di cultura, tenendo in seguito i preparati 4 ore in termostato, non dimostra nessuna azione battericida, che invece è discrèta, se gl'innesti vengono fatti con piccole quantità.

Azioni del siero di sangue di cavia normale sul v. del colera.

Esperienza I. — 13 gennaio.

Siero	Emulsione di cultura $^1/_{10}$	Piastre con una piccola ansa dopo l'innesto	
		a) subito dopo l'innesto	b) dopo 4 ore a 37°
1) 0.25 cmc.	2 gocce capillari	150,000	240,000
2) 0.25 »	1 goccia capillare	100,000	150,000
3) 0.25 »	1 grossa ansa	37,000	180,000
4) 0.25 »	1 piccola ansa	15,000	15,000

Facendo esperimenti comparativi per vedere l'azione del siero di sangue, del liquido peritoneale *in toto* e dell'umor acqueo, tenendo i preparati 4 ore in termostato, non si osservava alcuna differenza tra i vari liquidi. Si nota in generale una discreta azione battericida per i piccoli innesti. Il siero di sangue sembra agire un poco più intensamente che gli altri liquidi, e così pure dopo 24 ore; allora però anche l'umor acqueo sembra avere una identica azione.

Azione di vari liquidi organici sul v. del colera.

Esperienza II. — 15-16 gennaio. — Umore acqueo *A*; siero di sangue *B*; liquido peritoneale *C*.

Per ogni serie la prima goccia pendente viene fatta con una goccia capillare di liquido + 1 ago di platino di emulsione di cultura; le ulteriori diluizioni sono successivamente fatte con aghi di platino tolti dalla diluizione che immediatamente precede. Vengono fatti preparati in goccia pendente, che poi vengono osservati al microscopio. Non piastre.

A		*B*		*C*	
dopo 4 ore	dopo 24 ore	dopo 4 ore	dopo 24 ore	dopo 4 ore	dopo 24 ore
1) Molti bacilli, come nel controllo in brodo.	1) Molti bacilli tutti immobili.	1) Agglutinazione e pochi bacilli mobili.	1) Enorme aumento di germi.	1) Agglutinazione e pochi germi mobili.	1) Agglutinazione e molti bacilli mobili.
2) Scarso aumento come nel controllo in brodo.	2) —	2) Scarso aumento di germi.	2) —	2) Scarso aumento.	2) Agglutinazione e parecchi germi mobili.
3) Pochissimi bacilli.	3) Scarsissimi bacilli tutti immobili.	3) Pochi bacilli mobili.	3) Non si veggono germi.	3) Pochi bacilli.	3) Aumento di germi.
4) Non si vede alcun germe.	4) Non si veggono germi.	4) Non si veggono germi.	4) Non si veggono germi.	4) Non si veggono germi,	4) Non si veggono germi.
5) Non si veggono germi.	5) Non si veggono germi.	5) Non si veggono germi.	5) Non si veggono germi.	5) Non si veggono germi.	5) Non si veggono germi.

Altra volta paragonammo l'azione del siero normale atttivo ed inattivato, esponendolo a 58° per mezz'ora, e così anche del liquido peritoneale, e del liquido peritoneale più siero di sangue inattivato. Il risultato non variava sensibilmente, non vi fu talvolta non solo nessuna differenza tra siero di sangue attivo ed inattivo, ma anche tra liquido peritoneale e siero di sangue, contrariamente ad altri esperimenti, in cui questo si dimostrava più attivo. Non si aveva una vera e propria azione battericida, ma soltanto di arresto di sviluppo nelle prime ore di contatto.

Esperienza III. — 17 gennaio. — V. del colera. Azione del siero di sangue normale (*A*). Azione del siero di sangue normale inattivato mezz'ora a 58° (*B*). Azione del liquido peritoneale (*C*). Azione del liquido peritoneale + siero di sangue inattivato (*D*). — L'innesto viene fatto con l'emulsione di 1 cultura in agar in 2 culture di brodo. Ogni preparato contiene 1 ansa di liquido + un ago di platino di emulsione come sopra.

A		*B*		*C*		*D*	
Dopo 5 ore	Dopo 24 ore	Dopo 5 ore	Dopo 24 ore	Dopo 5 ore	Dopo 24 ore	Dopo 5 ore	Dopo 24 ore
1) aumento	1) grande aumento	1) aumento di germi	1) aumento	1) aumento	1) grande aumento	1) aumento	1) grande aumento
2) aumento	2) aumento	2 aumento	2) aumento	2) aumento	2) aumento	2) aumento	2) aumento
3) pochi germi	3) pochi bacilli	3) pochi bacilli	3) pochissimi germi immobili	3)	3) pochissimi germi mobili	3)	3) pochissimi germi immobili

L'iniezione di 1 cmc. di emulsione di aleuronato al 20 % non modifica il modo di agire del siero di sangue di un animale normale. Anche qui si osserva arresto di sviluppo nelle prime ore.

Esperienza IV. — 19 gennaio. — Azione del siero di sangue normale di cavia (*A*). Azione del siero di sangue dell'animale trattato i. p. con aleurone (*B*).

A		*B*	
Dopo 4 ore	Dopo 24 ore	Dopo 4 ore	Dopo 24 ore
1) poco aumento	1) grande aumento	1) poco aumento	1) grande aumento
2) quasi nessuno aumento	2) quasi nessuno aumento	2) quasi nessuno aumento	2) ricco sviluppo
3) poco aumento	3) quasi nessuno aumento	3) quasi nessuno aumento	3) abbondante sviluppo
4) scarsissimi germi	4) scarsissimi germi	4) scarsissimi g rmi	4)

Esperienza V. — 22 gennaio. — Azione del liquido peritoneale congelato e disgelato più volte di animale normale (*A*) e di animale immunizzato per via peritoneale (*B*). Un'ansa di liquido peritoneale + 1 piccola ansa di emulsione di cultura. I preparati sono tenuti 4 ore in termostato, poi si fanno piastre. Emulsione in brodo di $^1/_{10}$, $^1/_{100}$, $^1/_{1000}$ di cultura in agar.

Controllo in brodo		*A*	*B*
1) $^1/_{10}$	= ∞	∞	21000
2) $^1/_{100}$	= 75000	∞	1500
3) $^1/_{1000}$	= 9000	20000	200
4) $^1/_{5000}$	= 2200	5000	0
5) $^1/_{10000}$	= 1000	0	0

Quanto poi all'esame comparativo tra l'azione del siero peritoneale e della parte corpuscolare disciolta per successivi congelamenti e disgelamenti del liquido peritoneale, si nota grande differenza tra il siero di animali normali ed immunizzati; nell'un caso e nell'altro l'azione della parte corpuscolata disciolta è assai minore, si che non si può dire che col congelamento si lasciano dai leucociti estrarre sostanze battericide; anzi sembra quasi che si verifichi il contrario.

Esperienza VI. — 23 gennaio. — Confronto dell'azione del siero peritoneale (*A*) e del sedimento corpuscolato più volte congelato e disgelato (*B*). La disposizione è come nell'esperienza precedente; 4 ore in termostato.

Controllo in brodo		A	B
1) $^1/_{10}$	= ∞	∞	∞
2) $^1/_{100}$	= 75000	∞	∞
3) $^1/_{1000}$	= 10000	7500	10000
4) $^1/_{5000}$	= 1800	150	1500
5) $^1/_{10000}$	= 750	rarissimi	rarissimi

Esperienza VII. — 24 gennaio. — Confronto dell'azione del siero peritoneale (*A*); e del sedimento corpuscolato più volte congelato e disgelato (*B*); del liquido peritoneale di animale immunizzato per via peritoneale. Disposizione dell'esperienza come sopra, però l'innesto della cultura viene fatto con un *ago di platino* della relativa emulsione:

	A	B
1) $^1/_{10}$	= 15000	15000
2) $^1/_{100}$	= 4500	7500
3) $^1/_{1000}$	= 0	400
4) $^1/_{5000}$	= 0	0
5) $^1/_{10000}$	= 0	0

Esperienza VIII. — 23 gennaio. — Confronto dell'azione del siero di sangue di animale normale (*A*); e del siero di sangue di animale immunizzato per via peritoneale (*B*). Disposizione dell'esperienza come al n. 7:

	A	B
1) $^1/_{10}$	= ∞	3000
2) $^1/_{100}$	= 1500	3000
3) $^1/_{1000}$	= 0	0
4) $^1/_{5000}$	= 0	0

Dissenteria.

Più complete furono le osservazioni sulla dissenteria. Gli animali venivano trattati sempre in serie per ciascuna dose, e per ciascuna dose venivano sacrificati in tempi diversi dal momento dell'iniezione.

Se si inietta $^1/_{200}$ di cultura in agar (dose per niente letale) si osserva per lo più graduale scomparsa dei germi, che dopo 5 ore è quasi completa. In seguito compaiono molti leucociti, e l'animale vince l'infezione. Se si uccide però l'animale dopo alcune ore dall'iniezione, si trovano ancora sulle pareti del peritoneo, e sovratutto sull'omento, una quantità di bacilli abbastanza grande, la massima parte mal colorati, e per lo più fagocitati dai leucociti, migrati in massa.

2 cavie ricevono i. p. $^1/_{200}$ di cultura in agar di bac. dissenterico.

Cavia 1, 210 grm. (1) uccisa dopo 1 ora.

Piastre.

Essudato libero, in tutto 140,000 germi.
Id. sul fegato (2) e sulla milza, in tutto 130,000 germi.
Id. sull'intestino (2), in tutto 270,000 germi.
Milza (intiera), 16,000 germi.
Fegato (calcolato intiero), 300,000 germi.
Polmone (tutto), 3,000.
Sangue in totalità), 7,000.

Cavia 2, 300 grm.

Piastre (un'ansa di liquido peritoneale).

Dopo 45', 250.
» 3 ore, 20.
» 5 ore, 10.
» 5 ore i bacilli sono scomparsi dall'essudato peritoneale. La diminuzione di essi ha avuto luogo gradualmente.

Se si inietta $^1/_{60}$, $^1/_{30}$, $^1/_{20}$, il quadro cambia alquanto, poichè l'animale muore ordinariamente dopo giorni o settimane, e mostra anche dopo questo tempo qualche bacillo nell'essudato e specialmente nell'omento, sebbene in numero molto limitato e dimostrabile solo colla cultura. Il sangue invece si conserva sterile, e scarsissimi bacilli si trovano negli organi. In tutti questi casi la fagocitosi specialmente nell'omento è bene evidente, la degenerazione dei bacilli liberi non è così facile a vedersi come nel colera; più scarsi sono invece i granuli.

Cavie inoculate con $^1/_{50}$ di cultura in agar i. p.

Cavia 3 (29 gennaio). 290 grm., uccisa dopo ore 6,30.
Dopo 15', molti bacilli, quasi nessun leucocita. Non agglutinazione.
Dopo 2 ore. molti bacilli (quasi come dopo 15'), pochi leucociti.
Dopo 3 ore, pochi bacilli, molte forme alterate, cresciuti i leucociti.
Dopo 4 ore, quasi nessun bacillo. Forme degenerative discretamente numerose. Molti leucociti in parte alterati, in parte in ammassi, altri ben conservati ed isolati.
Dopo ore 6 30, nessun bacillo, molti leucociti. Parecchi corpi sferoidali, manifestamente nuclei alterati di leucociti.

---

(1) Esperimento del prof. Kruse e dott. Hösch
(2) Gli organi furono ripetutamente lavati.

Piastre dell'essudato (una piccola ansa).

Dopo 15', 60,000.
Dopo 2 ore, 40,000.
Dopo 3 ore, 21,000.
Dopo 4 ore, 100.
Dopo 6 ore, 0.

Piastre degli organi e del sangue.

Sangue, 1 cc., 0.
Polmone, 1 gr., 400,
Milza, 0,5, 0.

Le gocce pendenti dell'essudato mantenute a 370, 2 ore, non mostrano (all'infuori di quelle dopo 15') nessun aumento.

Piastre.

Dopo 15' (dopo 2 ore in stufa), 150,000.
Dopo 2 ore, 15,000.
Dopo 3 ore, 10,000.
Dopo 4 ore, —
Dopo 6 ore, 0.

Cavia 4 (31 gennaio), 290 grm., uccisa dopo 2 ore.

Dopo 2 ore, parecchi leucociti e scarsi germi nel liquido peritoneale.

Piastre dall'essudato e degli organi.

Liquido peritoneale, 1 cc., 1 milione.
Sangue, 1 cc., 0.
Polmone, 1 grm., 0.
Milza, 1 grm., 1000,
Per le gocce pendenti v. ultima tabella.

Cavia 5, 280 grm., muore dopo 2 giorni.

Piastre del liquido peritoneale e degli organi.

Liquido peritoneale, 1 cc., 300,000.
Sangue, 1 cc.. 0
Polmone, 1 grm., 400.
Milza, 0,5 grm., 20.
Rene, 1 grm., 60.

Cavia 6, 280 grm., muore dopo 7 giorni.

Cavia 6 *a*, 220 grm. (1), uccisa dopo 1 ora.

---

(1) Esperimento del prof. Kruse e dott. Hösch.

Piastre.

Essudato riunito (1) di tutto il peritoneo, fuorchè l'omento, 12 ½ milioni.
Omento, 5 ½ milioni.
Milza (intiera), 57,000
Fegato (intiero), *in toto*, 1 ½ milioni.
Polmone (in tot.), 10,000.
Sangue (in totalità), 9000.

Cavie inoculate i. p. con 1/20 ed 1/20 di cultura in agar.

Cavia 7 (9 febbraio), 4 cavie 270 grm. ricevono 1/20 cult. i. p.
Muoiono dopo 4-5-7 giorni.

Piastre.

Dopo 1 ora e 30 scompaiano i germi dal peritoneo (100 in un'ansa).

Cavia 8 (10 febbraio), 1 cavia 250 grm. riceve 1/20 cult. i. p.

Piastre.

Dopo 2 ore, un'ansa di essudato peritoneale contiene 30,000 germi. Muore dopo 2 giorni.

Piastre.

Essudato peritoneale, una piccola ansa, 50 colonie.
Depositi fibrinosi sugli organi addominali, 1 piccola ansa, 350 colonie.
Sangue, 1 cc. 0.
Polmone, 1 grm. 700.
Milza, 0.5, 600.
Rene, 1 grm., 60.
Omento molti (non contati).

Cavia 9 (13 febbraio), cavia 250 gr. riceve i. p. 1/20 cultura.
Viene uccisa dopo 4 ore.
Dopo 2 ore un'ansa di essudato contiene circa 300,000 germi.

Piastre.

Essudato peritoneale dopo 4 ore 1 piccola ansa, 100,000.
Sangue, 1 cc. 0.

Questi animali muoiono dunque d'intossicazione subacuta benchè vincano presto l'infezione. E' vero che nell'essudato restano sempre dei bacilli viventi, ma sempre così scarsi che in un animale sano sarebbero del tutto innocui.

---

(1) Libero e degli organi, lavati nel modo solito.

Un decimo di coltura in agar uccide ordinariamente in 6-10 ore, ed anche qui si ha per lo più diminuzione (in generale più lenta) di germi nel liquido peritoneale. Solo bisogna osservare che si hanno, come nel colera, differenze abbastanza notevoli tra i singoli animali, scomparendo talora i batteri rapidamente, mantenendosi invece altre volte abbastanza a lungo.

Cavie. Iniezione i. p. $^1/_{10}$ di cultura in agar.

Cavia 10, 250 grm., uccisa dopo 2′.

Gli organi addominali, dopo avere estratto e misurato il liquido addominale, e fattene piastre, vengono lavate in soluzione fisiologica sterile ripetutamente. Dalle varie acque di lavaggio si fanno isolatamente piastre.

Piastre.

Essudato libero $^1/_2$ cc. 500 milioni.
Omento 20 milioni.
Sangue 200,000.
Nell'omento si osserva poca fagocitosi.

Cavia 11, 280 grm., uccisa dopo 15′.

Lo stesso procedimento come nell'animale precedente.

Piastre.

Essudato libero 2 cc. 900 milioni.
Omento 16 milioni.
Sangue in totalità 4 milioni.
Sull'omento molti bacilli in parte ammassati sotto forma di strisce. Ammassi di leucociti, discreta fagocitosi da parte anche delle cellule mononucleari.

Cavia 12, 270. grm., uccisa dopo 20′.

Nel liquido peritoneale molti bacilli, scarsi leucociti, fagocitosi assente.

Omento. Molti bacilli, qua e là anche in ammassi. Spesso sono ordinati a strisce, scarsi ammassi di leucociti. Scarsa fagocitosi, anche da parte di grossi elementi mononucleari.

Piastre.

Essudato 1.5 cc. 500 milioni.
Sangue 1 cc. 1100.
Polmone 1 grm., 12.000.
Fegato 1 grm. 45,000.
Omento 10 milioni.

Cavia 13, 270 grm., uccisa dopo 2 ore.

Nel liquido peritoneale si osserva:

Dopo 15'. Molti bacilli, scarsi leucociti.

Dopo 45'. Bacilli diminuiti, molti granuli, pochissimi leucociti.

Dopo 1 ora e 30. Bacilli molto diminuiti, granuli discretamente numerosi, pochi leucociti.

Piastre del liquido peritoneale.

Dopo 15' 300,000.
Dopo 45' 60.000.
Dopo 1 ora e 30 30,000.
Dopo 2 ore 22,000.

Sezionato l'animale si fanno piastre oltre che dagli organi, anche dai depositi fibrinosi della parete e dei visceri.

Essudato sulla superficie del fegato 1 ansa 6,000.
Id. dalla superficie dell'intestino 1 ansa 4,500,
Id. dalla parete addominale 1 ansa 75,000.

Sangue 1 cc. 200.
Fegato 1 grm, 2,000.
Rene 1 grm. 1,000.
Polmone 0.
Omento 31 milioni.

Nell'omento fagocitosi intensa dei leucociti e degli elementi fissi.

Cavia 14, 310 grm., muore dopo 6 ore e 30.

Dopo 5' molti bacilli e pochi leucociti.

Dopo 1 ora i bacilli sembrano aumentati; pochi leucociti quasi tutti alterati.

Dopa 3 ore, stazionaria la quantità dei bacilli; rari leucociti in parte alterati.

Dopo 6 ore, come dopo 3 ore.

Piastre del liquido peritoneale (una piccola ansa).

Dopo 5' 100,000.
» 1 ora 375,000.
» 3 ore 90,000.
» 6 ore 90,000.

Piastre degli organi.

Sangue 1 cc. 4,500.
Polmone 1 grm. 18,000.

Le gocce pendenti dell'essudato estratto, tenute a 37°, non mostrano da 5' in poi, sviluppo di germi fuorchè la prima.

Cavia 15, 280 grm., muore dopo 7 ore.

In tutti i preparati da 30' in poi, pochi leucociti.

Dopo 7 ore alquanto più numerosi, ma appaiano profondamente alterati. Non si osserva fagocitosi.

Piastre del liquido peritoneale (una piccola ansa).

Dopo 30′ 450,000.
» 2 ore 75,000.
» 5 ore 30,000.
» 7 ore 9,000.

Piastre degli organi.

Sangue 1 cc. 2,800.
Fegato 1 grm. 20,000.
Omento ($^{2}/_{3}$) 44 milioni.
Polmone 1 grm. 10,000.
Rene 1 grm. 700.
Moltissimi bacilli sull'omento e negli ammassi fibrinosi depositati sugli organi.

Cavia 16, 270 grm., muore dopo 10 ore.

Reperto. Liquido peritoneale quasi normale, pochi elementi mononucleari. Rari microrganismi.

Cavia 17, 270 grm., muore dopo 10 ore.

Dopo 1 ora, molti bacilli, rari leucociti.
Dopo 3 ore, diminuiti i germi, scarsi leucociti.
Dopo 5 ore, molto diminuiti i germi, qualche leucocito.

Piastre del liquido peritoneale (una piccola ansa).

Dopo 1 ora 450,000.
» 4 ore 250,000.
» 5 ore 45,000.

Piastre degli organi.

Sangue 1 cc. 1,500.
Polmone 1 grm. 6,000.
Fegato 1 grm. 20,000.
Omento moltissimi (non contati).
Essudato libero 6 milioni.
Sull'omento germi abbondantissimi, in massima parte liberi. Discreto essudato. Leucociti poco alterati con qualche fagocito.

Le gocce pendenti conservate a 37°, mostrano aumento nell'essudato estratto dopo 1 ora; impedimento di sviluppo le altre.

Cavia 18, 290 grm., muore nella notte.

Diminuzione progressiva dei germi nell'essudato libero, in cui al momento della morte si trovano pochi bacilli, pochi leucociti, non fagociti.

Piastre del liquido peritoneale (una piccola ansa).

Dopo 15′ 220,000.
» 2 ore 40,000.
» 4 ore 20,000.

Piastre degli organi.

Sangue 1 cc. 200.
Polmone 1 grm. 600.
Fegato 1 grm. 5,000.
Rene 1 grm. 500.
Omento ($^2/_3$) 80 milioni.

Omento. Molti leucociti in grandissima parte in ammassi, e molti bacilli per lo più mal colorati: qua e là granuli. Discreta fagocitosi.

La diminuzione dei germi è dunque indubitabile; essi si trovano ancora molto abbondanti nell'omento, mentre sono scarsi nel sangue e negli organi interni. Calcolando questa diminuzione, per esempio, nella cavia n. 12 (per altre ancora potrebbe dirsi lo stesso), essa appare almeno di $^9/_{10}$ della quantità iniettata, trovandosi in tutto circa 100 milioni in luogo del miliardo introdotto nel peritoneo.

Sembra dunque che anche in questo caso, la morte dipenda più da una *intossicazione* che da una infezione. Le differenze nell'esito determinato da iniezioni di grandi e piccole quantità di germi dissenterici consistono solo in ciò, che nel primo caso i bacilli sono distrutti più lentamente e meno perfettamente che nel secondo, e che l'intossicazione è in esso più rapida. Osserviamo dunque lo stesso fatto già constatato nell'infezione peritoneale da vibrione di Koch; e come per il colera, dobbiamo concludere che le cosiddette endotossine non sono sufficienti a renderci una ragione della morte, ma che dobbiamo altresì invocare l'esistenza di sostanze tossiche messe in libertà da microrganismi *viventi*.

Per giudicare meglio sulle influenze che distruggono i germi, abbiamo uccisi gli animali in tutti gli stadi, della malattia, abbiamo studiato gli organi interni, i fenomeni degenerativi nell'essudato stesso, dentro e fuori dell'organismo, la fagocitosi nell'omento ed altrove. Prima di tutto, risulta dallo studio del sangue e degli organi che vi è sempre assorbimento di germi dal peritoneo nel sangue. Ma calcolando il numero di essi, si trova relativamente scarso, cosicchè *non possiamo credere che all'assorbimento sia da attribuirsi una grande importanza come fattore della distruzione batterica.* Ma che i bacilli assorbiti, per lo più periscono nel sangue, risulta dal fatto che negli animali uccisi immediatamente se ne ritrova una quantità molto maggiore, che non in quelli uccisi più tardivamente (per esempio, nel sangue del n. 11 se ne ritrovano nel sangue 4 milioni. Non è facile da queste esperienze trarre conclusioni sicure circa il meccanismo con cui i germi sono distrutti nel sangue; però sembra che almeno una grande importanza debba avere la *fagocitosi negli organi interni*, es-

sendo costantemente risultato che *il numero dei germi in essi contenuto è molto superiore a quello trovato nel sangue circolante* (del cuore). Ciò non si può spiegare se non colla fagocitosi da parte dei diversi elementi capaci di esercitarla.

La lotta dell'organismo contro i germi iniettati si decide dunque essenzialmente nel peritoneo stesso, ma dove? nell'essudato libero, sulle pareti, o nell'omento.? Crediamo che l'influenza diretta delle pareti e sovrattutto dell'omento, non è da trascurarsi, poichè in quest'ultimo specialmente si deposita una gran quantità di batteri subito dopo l'inoculazione. Probabilmente a ciò partecipano principalmente i leucociti (poli- e mononucleati) contenuti nel liquido peritoneale, poichè, uccidendo gli animali poco dopo l'innesto, essi si trovano ammassati sulle pareti e più ancora sull'omento. Molti di questi leucociti contengono germi nel loro protoplasma. In più una discreta fagocitosi si osserva anche da parte delle cellule di rivestimento dell'omento. In tal modo si spiega la diminuzione del contenuto batterico, che si osserva subito dopo l'innesto; ma tale azione difensiva non deve d'altra parte esagerarsi, poichè paragonando il numero dei germi contenuti in tutto l'omento quelli contenuti nell'essudato stesso, vediamo che solo negli animali inoculati con piccole dosi esso è relativamente considerevole, mentre in quelli iniettati con la dose acutamente mortale, raggiunge dal principio in poi solo la cifra di 10-20 o i più 30-40 milioni mentre centinaia di milioni di germi sono contenuti nell'essudato libero.

Probabilmente una quantità più grande è fissata dai leucociti sulla parete degli altri organi addominali, e prevalentemente dell'intestino, ove però, data la larga superficie, non sono così facilmente dimostrabili come sull'omento, dove si ammassano. La sorte che subiscono i germi sulle pareti peritoneali e nell'omento, è chiara nel corso delle infezioni subacute, ove per lo più sono immediatamente distrutti per la fagocitosi, mentre quelli che sopravvivono le prime ore, sono presi dai leucociti che migrano dai vasi. Nel caso delle infezioni acutissime (con dosi più forti) una parte dei germi dell' omento in generale resta fuori delle cellule, un'altra ancora più tardi viene assorbita dai leucociti che migrano sempre dopo alcume ore dai vasi; ma i germi liberi non sembrano restare tutti in vita fino alla morte dell' animale, essi invece degenerano ugualmente a quanto si osserva nell'essudato.

Ed ora veniamo ai bacilli dell'essudato libero: nelle infezioni subacute in verità si può appena parlare di un essudato libero, poichè la quantità di esso resta sempre assai limitata. Esiste essudazione di

liquido, ma poco considerevole. Tutt'altro accade nelle infezioni acute. Qui si forma, da due ore in poi, un essudato abbondante, la cui quantità raggiunge 3-5 cmc.; e probabilmente alla maggiore diluizione che i germi vengono così a subire, si deve in gran parte la progressiva diminuzione batterica, che si osserva. Per parlare teleologicamente, si deve supporre che tale diluizione abbia il suo scopo; ed in verità che il liquido essudato non rappresenti un buon mezzo nutritivo per i bacilli della dissenteria, *viene già dimostrato dal fatto che essi non vi si sviluppano.* E siccome i leucociti entrano nella sua composizione solo in quantità trascurabile, dobbiamo concludere che vi esistano delle *alessine* o alcunchè di simile.

Come nel colera, abbiamo fatto qualche cultura dell'essudato peritoneale in vari periodi dell'infezione, anche per provare direttamente se vi erano proprietà battericide. Il risultato ottenuto fu infatti che nelle gocce pendenti (eccettuate quelle che furono fatte con essudato estratto nelle prime ore dell'infezione) non si osservava aumento di germi; però questi non degeneravano, cosicchè si trattava piuttosto di un impedimento di sviluppo che di una vera distruzione, ma è probabile che nel peritoneo stesso, dove l'essudato continuamente si rinnuova, l'influenza sia maggiore.

In altri casi esperimentammo con animali che avevano sopportato una dose non letale di $^1/_{50}$, $^1/_{20}$ di cultura in agar, e che perciò presentavano degli essudati più o meno ricchi di leucociti. Avvenuta la scomparsa dei batteri, paragonavamo (mercè inoculazione di nuovi germi) l'azione dell'intiero liquido peritoneale estratto alcune ore dopo l'infezione, con quella del liquido estratto prima dell'infezione stessa, ed altre volte infine l'azione del solo siero peritoneale con quella del sedimento corpuscolato (leucociti) e del sedimento gelato e disgelato.

Azione del liquido peritoneale di cavia, iniettata con cultura di b. dissenterico, dopo la scomparsa dei germi.

Esperienza I. — 29 gennaio. — Cavia 270 gr. riceve $^1/_{50}$ cultura i. p. dopo 4 ore nel liquido peritoneale non si osserva quasi nessun germe. Viene allora ucciso e provato il potere battericida contro il bac. dysenteriae; *A*) del liquido peritoneale intero; *B*) della parte sierosa dello stesso; *C*) della parte corpuscolata; *D*) della parte corpuscolata più volte gelata e disgelata. — Per le ricerche viene usata un'ansa di liquido peritoneale ed un ago di platino di emulsione di germi. I preparati vengono tenuti 4 ore in termostato, e poi da essi vengono fatte piastre. La quantità di bacilli contenuta nel liquido peritoneale, appena ucciso l'animale è di 30 in un'ansa. Fatto di esso un preparato e messo in termostato, dopo 4 ore i bacilli sono diminuiti ad 8 per ansa:

Controllo		A	B	C	D
1) $^1/_{10}$	= 45000	1500	4500	6000	2200
2) $^1/_{100}$	= 4500	200	500	1000	400
3) $^1/_{1000}$	= 400	10	100	10	40
4) $^1/_{5000}$	= 10)	10	10	20	0

Esperienza II. — 31 gennaio. — Cavia 280 gr. riceve $^1/_{50}$ di cultura i. p. dopo 2 ore mostra pochissimi germi nel liquido peritoneale. Questo estratto viene centrifugato e la parte sierosa viene provata per la sua azione battericida. Un'ansa di liquido peritoneale + un'ago di platino di emulsione di cultura: le piastre vengono fatte dopo permanenza di 2 ore in termostato. Un'ansa dell'essudato non centrifugato contiene 700 germi in tutto:

Controllo		Siero peritoneale
1) $^1/_{10}$	= 30000	18000
2) $^1/_{100}$	= 6000	3000
3) $^1/_{1000}$	= 800	300
4) $^1/_{5000}$	= 50	30

Esperienza III. — 5 febbraio. — Cavia 280 gr. $^1/_{50}$ cultura di bac-dysenteriae. Viene messa a confronto l'azione del liquido peritoneale centrifugato estratto prima dell'iniezione (*A*), col liquido peritoneale centrifugato estratto 3 ore dopo l'iniezione (*B*) e 30 ore dopo la stessa (*C*). Un'ansa di liquido peritoneale ed un ago di platino di emulsione di cultura. I preparati restano 2 ore in termostato; quindi vengono da essi fatte delle piastre.

Controllo		A	B	C
1) $^1/_{10}$	= 22000	7500	15000	1500
2) $^1/_{100}$	= 7500	4500	1500	800
3) $^1/_{1000}$	= 1000	400	100	..
4) $^1/_{5000}$	= 80	50	10	..

Esperienza IV. — 7 febbraio. — Cavia 280 gr. Riceve $^1/_{50}$ cultura bac-dysenteriae i. p. Confronto dell'azione del liquido peritoneale estratto prima dell'iniezione (*A*) e 3 ore dopo dell'iniezione (*B*). Un'ansa di liquido peritoneale non centrifugato ed un ago di emulsione di cultura. I preparati vengono lasciati 2 ore in termostato e poi fatte piastre:

Controllo		A	B
1) $^1/_{10}$	= 22000	4500	7500
2) $^1/_{100}$	= 7500	800	3000

Esperienza V. — 10 febbraio. — Cavia 270 grammi. $^1/_{25}$ di cultura di bac. dysenteriae i. p.

Dopo 2 ore un'ansa di liquido peritoneale contiene 30,000 bacilli. Si fanno due preparati in goccia pendente (ciascuno con un'ansa) e vi si aggiunge rispettivamente ad uno:

1) una picolissima ansa di una diluizione $^1/_{100}$ di cultura contenente 22,000 germi circa;

2) all'altro una piccolissima ansa di una diluizione $^{1}/_{200}$ di cultura contenente 12,500 germi circa.

Si lasciano i preparati in termostato a 37°, dopo 3 ore si fanno piastre e si contano così

da 1) 67,500 germi
» 2) 60,000 »

Dopo 4 ore dalla iniezione un'ansa di liquido peritoneale contiene 50 germi circa. Si fanno due preparati che si innestano come i precedenti.

Dopo 3 ore in termostato si contano

da 1) 15,000 germi
» 2) 4,500 »

Il fatto costante riscontrato fu che i pochi germi primitivamente esistenti nell'essudato e quelli ulteriormente aggiunti in scarsa quantità, diminuivano; mentre se l'inoculazione era più abbondante, si verificava arresto di sviluppo. Non furono trovate notevoli differenze tra il liquido peritoneale estratto prima dell'iniezione e 2 ore dopo. Il liquido estratto dopo 4 ore mostra azione battericida maggiore, quello estratto dopo 30 ore un'azione anche più intensa.

Per dimostrare meglio la importanza che spetta ai leucociti nelle esperienze in *vivo*, procedemmo prima nel modo seguente, già tante volte impiegato da altri AA.: Cavie del peso di 250-300 gm. ricevevano nel peritoneo 2 cmc. di una emulsione 20 % di aleurone sterilizzato a vapore per 3 giorni consecutivi. Dopo 5-7 ore esse presentavano ordinariamente una cospicua leucocitosi. Iniettando in questo periodo la dose letale di B. dissenterico i. p. quasi costantemente l'animale si salvava.

Facendo prove dell'essudato peritoneale per preparare vetrini che venivano poi colorati col bleu di metilene di Löffler, si vedevano in tal modo quasi tutti i germi fagocitati. Cosa che risulta anche più chiara, se si uccideva l'animale e si faceva un preparato dall'omento.

In tali esperienze, che vennero ripetute molte volte è tanto chiara l'influenza della leucocitosi e fagocitosi, che la grande importanza di questo fattore come mezzo potentissimo per salvare l'animale dalla infezione peritoneale di b. dissenterico, non si può mettere assolutamente in dubbio.

Anche per altre infezioni, come ad es. per il tifo, osservammo lo stesso fenomeno. Se invece d'iniettare i germi dopo alcune ore dalla iniezione di aleuronato, s'iniettano contemporaneamente con questo, si osserva il fenomeno inverso, e cioè l'animale va incontro ad una infezione più grave e muore anche per una dose normalmente inferiore alla letale (1).

---

(1) V Pane e Lotti. *Ueber Angriffsstoffe* (Aggressine). Centralblatt für Bakteriologie, Originale, Bd. XLIII, N. 7/8, 1907.

Per completare queste nozioni ed esaminare in tutti i suoi particolari tale azione leucocitaria e fagocitaria, abbiamo istituite delle ricerche in *vitro*.

Per ottenere un essudato ricco in leucociti, ci servimmo di cavie, iniettate 8 ore prima i. p. con emulsioni di aleuronato 20 % (2 cmc.) ed uccise mediante dissanguamento.

Aperta la cavità addominale ed aspirato il liquido (in generale 2-3 cmc.) mediante pipette sterilizzate, veniva raccolto in tubi paraffinati sterili e centrifugato. Il deposito di leucociti era ripetutamente lavato con soluzione fisiologica di cloruro di sodio: quindi, in provette da siero sterili, venivano fatte le miscele che indicheremo nell'esporre le singole esperienze.

Ricorremmo anche qui, per stabilire un parallelo colle precedenti ricerche, allo studio in goccia pendente, solo usando (giacchè la quantità del liquido lo permetteva) un'ansa di maggiori dimensioni (5 mgr.) per l'essudato, ed una piccolissima ansa per l'emulsione della cultura (0,3 mgr.). Nè mai trascurammo, insieme alle piastre (per cui cercavamo di ottenere la massima omogenizzazione dell'essudato, agitando la goccia pendente con una grossa ansa di acqua distillata, sì da sciogliere gli eventuali accumuli leucocitari), di eseguire ogni volta dei preparati colorati, i quali, fissati per 10' con alcool assoluto, venivano colorati con soluzione di bleu di metilene di Löffler.

Stabilimmo prima di tutto quale è il valore battericida del liquido peritoneale intero, estratto 8 ore dopo l'iniezione di aleurone, e del siero liberato dalle cellule mediante centrifugazione.

Le esperienze, molto numerose, dettero in generale risultati concordi, che riassumiamo nella tavola seguente:

TABELLA I.

ESPERIENZA I. — 15 maggio.

A = Siero peritoneale libero da cellule.
B = Siero peritoneale più leucociti.
C = Controllo — Per questo usammo una grossa ansa di soluzione fisiologica + la piccola ansa di emulsione di batteri.

	Innesto dei germi	Dopo 30'	Dopo 1 ora	Dopo 2 ore	Dopo 4 ore	*Osservazioni*
A		—	—	—	—	I preparati colorati mostrano in *B*, concordemente al risultato delle piastre, la notevolissima e progressiva diminuzione dei germi. Abbastanza notevole la fagocitosi
B	Ca 120,000	37,000	30,000	4500	3000	
C		—	—	—	∞	
A		—	—	—	90,000	
B	45000	15,000	9000	3000	1000	
C		—	—	—	moltissimi	
A		—	—	—	18,000	
B	15000	3000	500	200	0	
C		—	—	—	120,000	
A		—	—	—	700	
B	3000	—	—	—	0	
C		—	—	—	4500	

ESPERIENZA II. — 18 maggio. Le indicazioni come nell'esperienza precedente.

Innesto dei germi	Dopo 30′	Dopo 1 ora	Dopo ore 1.30	Dopo 2 ore	Dopo 4 ore	Dopo 8 ore	Osservazioni
A	..	60,000	..	55,000	120,000	∞	I preparati colorati si mostrano concordi col risultato delle piastre. Tanto in *A* che in *B* si vedono alcuni granuli liberi nei preparati dopo 1-2 ore. In *B* notevole fagocitosi.
B 90,000	45,000	9,000	1,500	1.000	200	6,000	
C	..	..	..	..	∞	∞	
A	..	30,000	..	20,000	45,000	moltissimi	
B 30,000	7,500	4,500	500	300	200	..	
C	..	..	..	..	moltissimi	∞	

I risultati dimostrano chiaramente l'azione dei leucociti; il siero liberato da cellule invece ha *scarsa azione*, la quale si manifesta solo come impedimento di sviluppo nelle prime ore. L'agglutinazione è scarsa, e può venir trascurata nella valutazione dei risultati avuti. Nei preparati con leucociti è notevole la fagocitosi, che si inizia abbastanza precocemente, essendo già intensa dopo 1 ora e raggiunge il suo massimo dopo 2 ore.

Però, *pur accordando alla fagocitosi un'azione importante sulla dissoluzione batterica, era necessario altresì stabilire quanto a questa contribuisce la presenza dei leucociti, considerati come rigeneratori di sostanze battericide*, o, come in generale si dice, di complemento. E tanto più era necessario porci questa questione, perchè in questi nostri esperimenti *in vitro* la fagocitosi da sola, pur essendo considerevole, appariva assai minore che non nel corpo vivente, e non sembrava spiegarci perfettamente la forte azione dell'essudato completo (siero + leucociti).

E' ormai noto per una serie di pregevoli lavori, tra cui ricordiamo quelli di Buchner (1), Hahn (2), Schattenfroh (3), Bail (4), Gengou (5), ecc., come è stato riconosciuto, che si possono estrarre dai leucociti sostanze battericide, capaci di influire sulla dissoluzione dei germi; nè qui entreremo a discutere se tali sostanze derivano da prodotti di secrezione cellulare degli elementi viventi [Buchner, loc. cit.; Hahn, loc. cit.; Van de Velde (6), Denys (7)] o unicamente dalla distruzione dei leucociti [Schattenfroh, loc. cit.; Metschnikoff (8)]; solo ricorderemo come il fatto è ammesso da molti AA. e per vari germi, pur non esistendo ancora accordo se vale per tutti, così, ad es., per il colera [Hahn, loc. cit.; Moxter (9), Ascher (10), Lambotte e Stienon (11)]. Inoltre non è ancora chiaro se queste sostanze sono identiche a quelle che si trovano nel sangue (Schattenfroh, loc. cit.; Bail, loc. cit.).

I metodi usati per escludere ogni azione fagocitaria dei leucociti e per estrarre da essi queste sostanze sono diversi: così il Buchner, Hahn, Schat-

(1) Archiv für Hygiene, Bd. XVII.
(2) Archiv für Hyg., Bd. XXV.
(3) Archiv für Hyg., Bd. XXXI, Id. XXXV.
(4) Berliner klinische Wochenschr., 1898, n. 22. Archiv für Hygiene, Bd 30 e 32.
(5) Annales de l'Institut Pasteur, t. XV.
(6) Centralblatt für Bakteriologie, Bd. XXIII.
(7) *La Cellule*, t. X.
(8) *Die Lehre von den Phagocyten und deren experimentelle Grundlagen Kolle und Wassermann.* Handb. der Pathog. mikrorgan. Bd. IV.
(9) Centralblatt für Bakteriologie, Bd. XXVI; Deutscher Medizin. Wochenschr., 1899, n. 42.
(10) Centralblatt für Bakter., Bd. XXXII, 1902, pag. 449.
(11) Centralblatt für Bakter., Bd. XL.

tenfroh usano successivi congelamenti e disgelamenti; Bail usa la stafilotossina (leucocidina), Van de Velde l'acqua stillata. Per il *b. dissentericus*, per quanto ci risulti, nessuna esperienza è stata fatta in proposito.

Nelle nostre ricerche noi abbiamo seguìto il metodo consigliato dal Buchner, attenendoci esattamente alle norme date da esso e dagli AA. successivi. I risultati sono esposti nelle seguenti tabelle:

TABELLA II.

ESPERIENZA III. — 10 maggio.

A) Siero peritoneale libero di cellule; *B*) Siero peritoneale libero + leucociti congelati e disgelati; *C*) Leucociti lavati con soluzione fisiologica di cloruro di sodio, e successivamente gelati e disgelati; *D*) Controllo.

	Innesto dei germi	Dopo 4 ore in termostato	*Osservazioni*
A	. . . .	13, 500	I preparati colorati mostrano che non esistono cellule. I germi appaiono ovunque, fuorchè nel controllo, in piccole catenelle.
B	13.500.	9, 000	
C	. . . .	22, 500	
D	. . . .	150, 000	

ESPERIENZA IV. — 18 maggio.

A) Siero peritoneale libero da cellule; *B*) Siero peritoneale + leucociti gelati e disgelati; *C*) Controllo.

Innesto dei germi	Dopo 1 ora	Dopo 2 ore	dopo 4 ore	*Osservazioni*
A	80,000	55,000	120,000	Nei preparati colorati, il numero dei germi appare minore in *B* che non in *A*. Le catenelle di bacilli appaiono più scarse e più corte.
B 90,000. .	60,000	45,000	37,000	
C	..	..	∞	
A	30,000	20,000	45,000	
B 30,000. .	27,000	15,000	18,000	
C	..	..	moltissimi	

ESPERIENZA V. — 23 maggio.

A) Siero peritoneale attivo, libero da cellule; *B*) Siero peritoneale attivo + leucociti; *C*) Siero peritoneale attivo + leucociti gelati e disgelati; *D* Leucociti lavati e sospesi in soluzione fisiologica, gelati e disgelati; *E*) Siero di sangue attivo; *F*) Siero di sangue inattivato; *G*) Siero di sangue inattivato + leucociti congelati; *H*) Controllo.

Innesto dei germi	Dopo 3 ore	Dopo 7 ore
A	120,000	∞
B	1,500	700
C	50,000	moltissimi
D 150,000 . .	90,000	moltissimi
E	9,000	4 000
F	moltissimi	∞
G	100,000	∞
H	∞	∞

Possiamo, per i risultati suesposti, concludere che l'azione delle sostanze battericide estratte dai leucociti è ben scarsa, e si manifesta solo come impedimento di sviluppo, minore ancora di quello del liquido peritoneale liberato da cellule. Aggiungendo al siero tali leucociti disciolti, essi ne elevano, ma scarsamente, il potere battericida. Se invece di siero attivo si usa siero di sangue (più battericida del siero peritoneale) inattivato, si osserva come i leucociti congelati portano ad un impedimento di sviluppo; però non è possibile di ottenere una riattivazione completa (esperienza 5ª).

Con ciò non dobbiamo concludere che dai leucociti non siano prodotte sostanze battericide verso il bacillo dissenterico, ma *che coi nostri metodi d'indagine non riesciamo ad estrarle, nè a dimostrare isolatamente l'azione di ciascuna di esse.* Che invece tali sostanze siano, almeno in parte, segregate dai leucociti risulta con probabilità dalle esperienze in goccia pendente, nelle quali i leucociti, *lavati e sospesi in soluzione fisiologica, pur non presentando alcuna fagocitosi, esercitano un certo potere antimicrobico* (V. più tardi, Tab. III).

Tali esperimenti vennero istituiti sovratutto per studiare un'altra influenza indiretta del liquido peritoneale sui batteri, che sembra molto più importante di quella diretta.

E' ormai noto come il Buchner (1) nella sua teoria di conciliazione tra dottrina fagocitaria ed umorale, ammette che nella fagocitosi di germi virulenti l'alessina del siero avrebbe importanza nel portare ad un indebolimento della capacità vitale dei germi stessi, in seguito al quale questi vengono più agevolmente assorbiti dai leucociti, che nel loro interno ne

(1) Münchener Medizin. Wochenschr., 1897, n. 47.

compirebbero la digestione. L'argomento oggi è stato nuovamente ripreso ed ampiamente svolto per due serie di lavori, l'una del Wright (1) e della sua scuola, l'altra del Neufeld e Rimpau (2). Il Wright dà il nome di opsonine alle sostanze del siero, deputate allo indebolimento dei germi, sì che questi possono essere successivamente fagocitati, il Neufeld invece le indica come batteriotropine. Le une e le altre presentano caratteri comuni, ma anche altri per cui debbono differenziarsi. Le une e le altre aumentano notevolmente negli animali naturalmente od artificialmente immunizzate, essendo in questo caso strettamente specifiche. Nel siero normale le opsonine si trovano contenute in modica quantità, e sono molteplici, diverse a seconda della molteplicità dei batteri; eccessivamente scarse e non dimostrabili sono invece le batteriotropine. Le prime (almeno quelle del siero normale) hanno dei caratteri per cui si avvicinano all'alessina del sangue, distruggendosi col riscaldamento di ½ ora a 56°; le batteriotropine dei sieri immuni presentano invece i caratteri degli ambocettori di Ehrlich, essendo termostabili.

Allo scopo di portare la dimostrazione sperimentale della esistenza di tali sostanze nel siero peritoneale o di sangue di animali normali od immuni, abbiamo istituite alcune serie di esperienze, atte a dimostrare l'azione battericida e rispettivamento fagocitaria dei leucociti usando questi da soli, sospesi in soluzione fisiologica, oppure uniti a siero attivo od inattivo.

E' vero che non è affatto sicuro che i leucociti ripetutamente lavati in soluzione fisiologica ed in essa sospesi conservino perfettamente la loro vitalità, ma ci deve bastare cha dalle ricerche di Schattenfroh, che noi confermiamo completamente, essi sono ancora capaci di movimenti ameboidi, e di fagocitare microrganismi (stafilococchi poco virulenti).

In una prima serie, abbiamo stabilite ricerche comparative con siero peritoneale normale attivo od inattivato, con o senza leucociti, e con soluzione fisiologica, in cui egualmente si trovano in emulsione leucociti ripetutamente lavati.

---

(1) Proc. Royal Society, 1903, vol. 72. British medical Journal, 1904.
(2) Deutsche Medizin. Wochenschrift, 1904; Zeitschrift für Hygiene, Bd. 51, 1905.

TABELLA III.

ESPERIENZA VI. — 8 maggio.

A) Siero peritoneale attivo libero da cellule; *B*) Siero peritoneale attivo + leucociti; *C*) Leucociti lavati e sospesi in soluzione fisiologica; *D*) Siero peritoneale inattivato; *E*) Siero peritoneale inattivato + leucociti; *F*) controllo.

Innesto dei germi	Dopo 4 ore	*Osservazioni*
A	9,000	Per la quantità dei germi, i preparati colorati confermano i risultati delle piastre. Non si vede nessuna fagocitosi in *C* ed *E*.
B	10	
C 10,500	12,000	
D	37,500	
E	45,000	
F	ca 100,000	

ESPERIENZA VII. — 18 maggio.

Per le indicazioni v. l'esperienza precedente.

Innesto dei germi	Dopo 4 ore	*Osservazioni*
A	13,500	Nessuna fagocitosi in *C* ed *E*. Manifesta la moltiplicazione dei germi accrescentisi in catenelle.
B	20	
C 13,500	9,000	
D	45,000	
E	30,000	
F	150,000	

Esperienza VIII. — 5 giugno.

Per le indicazioni v. l'esperienza VI.

Innesto dei germi	Dopo ore 3.30	*Osservazioni*
A	—	Nessuna fagocitosi in *C* ed *E*. Si ha in essi moltiplicazione di germi, accrescentisi in catenelle.
B	1,500	
C 90,000	75,000	
D	moltissimi	
E	moltissimi	
F	∞	
A	—	
B	100	
C 37,000	40,000	
D	75,000	
E	90,000	
F	moltissimi	

Esperienza IX. — 18 giugno.

A) Siero peritoneale libero da cellule; *B*) Siero peritoneale + leucociti; *C*) Leucociti lavati e sospesi in soluzione fisiologica; *D*) Controllo.

Innesto dei germi	Dopo ore 3.30	*Osservazioni*
A	60,000	Assente la fagocitosi in *C*. Moltiplicazione dei germi in piccole catenelle.
B 90,000	700	
C	60,000	
D	moltissimi	
A	20,000	
B 30,000	100	
C	15,000	
D	moltissimi	

I risultati sono evidenti: *Leucociti lavati e sospesi in soluzione fisiologica esercitano sui b. dissenterici una certa azione battericida,* la quale però si manifesta più come impedimento di sviluppo, che non come una vera e propria distruzione batterica; se uniti a siero inattivato, tale azione è pressochè nulla.

Nell'un caso e nell'altro possiamo per questi esperimenti (1) escludere l'influenza della fagocitosi. Questo potere dei leucociti conservati in vita è almeno abbastanza grande quanto quello dei leucociti distrutti, come abbiamo indicato. Pur facendo le debite riserve, poichè è evidente che anche nella goccia pendente, un certo numero di essi va incontro a morte, tuttavia questo fatto sta in favore per una secrezione di sostanze antibatteriche per parte dei leucociti viventi.

Se invece della soluzione fisiologica, si sospendono i leucociti in siero attivo, la fagocitosi è notevole, e con essa sembra stare in stretto rapporto la forte azione battericida.

Perciò dobbiamo concludere che per la fagocitosi *in vitro* di germi virulenti è necessaria la presenza di sostanze contenute nel siero, le quali si distruggono col riscaldamento di ½ ora a 56°, presentano cioè alcuni dei caratteri dell'alessina.

Pur tuttavia fa d'uopo riconoscere che nonostante l'esistenza di queste sostanze, paragonando nei loro rapporti quantitativi, quantità di germi e di essudato peritoneale, la distruzione batterica si compie in vitro più scarsamente ed in maggior tempo, che non abbiamo trovato nelle nostre precedenti esperienze nel corpo vivente.

Allo scopo di osservare se tale diminuita attività fagocitaria era imputabile ad una diminuzione della vitalità dei leucociti o ad altre influenze, abbiamo fatto, secondo il metodo ultimamente usato dal Petterson, nuove esperienze in *vivo*, che decorressero parallelamente a quelle in vitro.

Perciò aspirato nelle stesse condizioni che già abbiamo esposte, l'intero essudato peritoneale da una cavia, iniettata otto ore prima con emulsione di aleuronato, abbiamo portato questo stesso essudato (sia non modificato, sia liberandolo dalle cellule per mezzo di centrifugazione in tubi paraffinati, sia usando i leucociti ripetutamente lavati in soluzione fisiologica di

---

(1) E' vero che in altri esperimenti, specialmente eseguiti collo stafilococco, si osservava fagocitosi da parte dei leucociti lavati e sospesi in soluzione fisiologica o siero inattivato; ma i germi erano altresì meno virulenti; ed a questa ragione (per la mancanza di aggressine) più ancora che ad un lavaggio incompleto dei leucociti, crediamo di dovere attribuire la disparità dei risultati.

cloruro di sodio), nella cavità peritoneale di altri animali, insieme colla dose mortale di b. dissenterico.

TABELLA IV.

ESPERIENZA X. 26 giugno. — Cavia di 350 grm. Riceve i. p. $^1/_{10}$ di cultura in agar di bac. dissenterico, + 1 cmc. di essudato intero, tolto ad una cavia iniettata 8 ore prima con un'emulsione di aleuronato.

Piastre		*Osservazioni.*
(un'ansa di liquido peritoneale)		Muore dopo 6 giorni.
dopo 40′.	3750	
dopo ore 4,30.	10	

ESPERIENZA XI. — 18 giugno. — Cavia di 300 gr. trattata come sopra. Viene uccisa dopo 45′.

Piastre.		*Osservazioni.*
Liquido peritoneale (1 ansa)	600	I preparati colorati dell'essudato mostrano una notevolissima fagocitosi. Questa è straordinariamente attiva nell'omento, ove si trova, raccolta in ammassi, la maggior parte dei leucociti.
Sangue, 1 cmc.	0	
Omento, in tutto	750,000	

ESPERIENZA XII. — 5 luglio. — Cavia, 290 grm. Riceve i. p. $^1/_{10}$ di cultura in agar di bac. dissenterico, + 1 cmc. di essudato peritoneale, liberato dalle cellule, ottenuto come nell'esperienza 10ª. Muore dopo 6 ore.

Piastre.		*Osservazioni.*
Essudato peritoneale (1 ansa)		Nel preparato colorato dell'omento si osservano germi in quantità notevolissima, riuniti in accumuli, fortemente agglutinati; la fagocitosi è notevole negli scarsi leucociti esistenti.
dopo 30′	60,000	
dopo 2 ore	700	
dopo 5 ore	600	
Sangue, 1 cc.	100	
Omento (da diluizioni) oltre 30 milioni.		

ESPERIENZA XIII. — 6 luglio. — Cavia, 260 grm., trattata come la precedente. Muore dopo 16 ore.

Piastre.		*Osservazioni,*
Essudato peritoneale (1 ansa)		Nei preparati colorati dell'essudato dopo 16 ore si osservano fagociti in discreto numero, con leucocitosi notevole.
dopo 30′	135,000	
dopo 2 ore	135,000	
dopo 4 ore	120,000	
dopo 16 ore	∞	
Sangue, 1 cc.	15,000	
Omento (da diluizioni) 135 milioni,		

Esperienza XIV. — 11 luglio. — Cavia, 220 grm., trattata come la precedente. Muore dopo 9 ore.

Piastre.		*Osservazioni.*
Liquido peritoneale (1 ansa)		Omento. Innumerevoli i batteri, scarsissimi i leucociti.
dopo 30′	150,000	
dopo ore 1,30	105,000	
dopo 2 ore	200,000	
dopo 9 ore	∞	
Sangue, 1 cc.	15,000	

Esperienza XV. — 26 giugno. — Cavia, 310 grm. Riceve i. p. $^1/_{10}$ di cultura in agar di bac. dissenterico + 1 cmc. di leucociti lavati e sospesi in soluzione fisiologica, ottenuti dall'essudato, prodotto dall'aleurone come nelle esperienze precedenti.

Piastre.		*Osservazioni.*
Liquido peritoneale (1 ansa)		Muore dopo 6 giorni
dopo 30′.	120,000	
dopo ore 3,30	75,000	
dopo 20 ore	100	

Esperienza XVI. — 5 luglio. — Cavia, 290 grm., trattata come la precedente.

Piastre.		*Osservazioni.*
Liquido peritoneale (1 ansa)		Muore dopo 5 giorni.
dopo 30′	60,000	
dopo 2 ore	52,500	
dopo 4 ore	4,500	
dopo 15 ore.	400	

Esperienza XVII. — 28 luglio. — Cavia, 250 grm., trattata come la precedente.

Piastre.		*Osservazioni.*
Liquido peritoneale (1 ansa)		Muore dopo 6 giorni. Scarsi batteri nell'omento.
dopo 15′	105,000	
dopo 45′	4,500	
dopo 2 ore	3,000	
dopo ore 8,30.	300	

Esperienza XVIII. — 28 luglio. — Cavia, 250 grm., trattata come la precedente.

Piastre.		*Osservazioni.*
Liquido peritoneale (1 ansa)		Viene uccisa dopo 45′. Preparati colorati dell'essudato e dell'omento mostrano una vivacissima fagocitosi, esercitata dai leucociti, depositatosi per massima parte in grandi ammassi sull'omento.
dopo 15′	40,000	
dopo 45′	15,000	
Sangue, 1 cc.	0	
Omento, in tutto 3 milioni.		

Dalle esperienze surriferite, risulta chiaramente che il liquido peritoneale intero ha nel corpo vivente una notevolissima azione battericida (esperienze 10 e 11) pari a quella che si osserva negli animali a peritoneo preparato, e com'essa riferibile alla fagocitosi. Negli animali, in cui si usano, invece del l. perit. intero, dei leucociti lavati (esperienze 15, 16, 17, 18) si osserva la stessa azione; solamente essa si compie in un periodo di tempo un poco più lungo, poichè le sostanze opsoniche presenti nel peritoneo. non sono in un primo tempo sufficienti, ma solo lo divengono, quando una maggior quantità venga apportata dai vasi sanguigni.

La vitalità dei leucociti sembra adunque abbastanza ben conservata nonostante i ripetuti lavaggi; e se in vitro, usando siero normale inattivato o soluzione fisiologica la fagocitosi manca, ciò è imputabile alla mancanza di opsonine.

Se invece si usa nel peritoneo il siero liberato da cellule, questo non mostra alcuna azione difensiva, che può facilmente spiegarsi, ove si consideri, che il liquido peritoneale anche in vitro risulta provvisto di un'azione battericida scarsissima, che, usando forti concentrazioni di germi, non è capace d'impedirne il rapido accrescimento.

Se invece di siero normale si usa nelle gocce pendenti siero immune, le cose procedono non solo con diverso grado d'intensità, ma anche con alcune varianti. Come siero immune ci siamo serviti di siero di sangue di asino, preparato dal Kruse a scopo terapeutico. La tecnica seguita è stata identica: solo che qui dobbiamo premettere, di aver dovuto attribuire alla conta delle piastre un'importanza minore che ai preparati colorati, per l'alto potere agglutinante del siero in parola. Nella tabella seguente sono esposte alcune ricerche comparative tra siero peritoneale e di sangue normale, e siero immune attivi ed inattivati, studiati da soli e con leucociti.

Esperienza XIX. — 26 giugno.

A) Siero peritoneale libero da cellule; *B*) Lo stesso + leucociti; *C*) Siero di sangue attivo; *D*) Lo stesso + leucociti; *E*) Siero di sangue inattivato; *F*) Lo stesso + leucociti; *G*) Siero di sangue immune inattivato (diluiz. $^1/_{100}$); *H*) Lo stesso + leucociti; *I*) Siero di sangue immune inattivato (diluiz. $^1/_{100}$ + siero di sangue normale attivo (complemento); *L*) Lo stesso come *I* + leucociti; *M*) Leucociti lavati e sospesi in soluz. fisiologica; *N*) Controllo.

Innesto dei germi	Dopo 1 ora e 30	Dopo 3 ore	Osservazioni
A	. . .	∞	Dai preparati colorati risulta fagocitosi notevole in *B* e *D*; assente in *E* ed *M*; col siero di sangue immune, sia inattivato (*H*) sia con aggiunta di complemento (*L*) la fagocitosi è ancora più notevole, in *L* più che in *H*. La maggior parte dei germi si trova contenuta nei leucociti sotto forma di granuli.
B	30,000	2,200	
C moltissimi .	. . .	37,500	
D	6,000	2,000	
E	. . .	∞	
F (ca 400,000).	moltissimi	∞	
G	. . .	75 000	
H	30,000	12,000	
I	. . .	1,000	
L	9,000	2,500	
M	moltissimi	∞	
N	. . .	∞	

Esperienza XX. — 4 luglio.

A) Siero peritoneale libero da cellule; *B*) Siero di sangue dello stesso animale; *C*) Lo stesso + leucociti; *D*) Siero immune inattivato ($^1/_{100}$); *E*) Lo stesso + leucociti; *F*) Lo stesso come *D* + complemento (siero di sangue attivo); *G*) Lo stesso come *F* + leucociti; *H*) Controllo.

Innesto dei germi	dopo un' ora	dopo due ore	dopo tre ore e $^1/_2$	dopo sette ore	Osservazioni
A.	. .	. .	moltissimi	∞	Fagocitosi abbastanza notevole in *C*, massima dopo due ore; più notevole e precoce (massima dopo un'ora) in *E*; notevolissima in *G*. La massima parte dei germi contenuta nell' interno delle cellule appare sotto forma di granuli.
B.	. .	. .	moltissimi	∞	
C moltissimi .	75,000	22,500	15,000	15,000	
D.	. .	. .	75,000	moltissimi	
E ca 400.000 .	90,000	18.000	20,000	30,000	
F.	. .	. .	18,000	135,000	
G	52,000	30,000	20,000	15.000	
H.	. .	. .	∞	∞	

ESPERIENZA XXI. — 20 luglio.

A) Siero peritoneale libero da cellule; *B*) Lo stesso + leucociti; *E*) Siero immune inattivato (1/100) + leucociti; *F*) Siero immune inattivato (1/100) + complemento + leucociti; *G*) Leucociti lavati e sospesi in soluzione fisiologica; *H*) Controllo.

Innesto dei germi	Dopo 30′	Dopo ore tre e 1/2	*Osservazioni*
A	Moltissimi	Moltissimi	
B	Moltissimi	50,000	Nessuna fagocitosi dopo 30′; notevole dopo ore 3 1/2
C Moltissimi .	Moltissimi	45,000	
D	45,000	2,200	Fagocitosi abbastanza notevole dopo 30′
E Ca 400,000	Discreta fagocitosi	Molti granuli nell'interno delle cellule.	
F	Fagocitosi vivissima; batteri molto scarsi	Nessun germe libero: alcuni granuli nell'interno delle cellule	
G	Moltissimi germi; nessuna fagocitosi	Moltissimi germi; non fagocitosi	
H	—	∞	

La differenza principale tra siero immune e normale, consiste nel fatto, che, usando l'uno e l'altro inattivato, mentre nel primo si ha fagocitosi notevole, iniziatasi assai precocemente, nel secondo questa manca del tutto. In rapporto con questa fagocitosi, si ha diminuzione di germi nel primo, la quale manca nel secondo.

Però anche col siero immune, non è indifferente per la fagocitosi il complemento; poichè la presenza di questo rende molto più evidente e rapido il fenomeno e maggiore il potere battericida.

Perciò dobbiamo concludere che alla fagocitosi del *bacillus dissentericus*, contribuisce grandemente l'esistenza nel siero di sostanze termolabili e termostabili. Le une e le altre, se separate, esercitano modica azione, la quale è massima, se invece si usano unite.

La loro influenza è in rapporto col potere battericida; ove questo è maggiore, maggiore altresì è la fagocitosi.

All'infuori di questa però, bisogna altresì considerare che la maggior potenza microbicida osservata nelle combinazioni di siero normale e siero immune si spiega in parte per la dissoluzione extracellulare batterica, dovuta alla riunione del complemento cogli ambocettori; ma su questo punto non entreremo, essendo tale influenza del siero specifico già stata dimostrata dal Kruse.

Nel peritoneo dell'animale vivente, si hanno probabilmente le stesse due azioni del siero specifico, e cioè l'aumento del potere battericida e l'aumento del potere opsonico, od in altre parole della batteriolisi extracellulare, e della fagocitosi per parte dei leucociti.

Se poi le sostanze opsoniche termostabili e termolabili possono identificarsi cogli ambocettori e complemento, non possiamo in modo sicuro stabilire: purtuttavia crediamo fino ad un certo punto verosimile quest'ipotesi. Già il fatto che il potere opsonico è massimo alla stessa diluizione di siero immune $^{1}/_{100}$) a cui è massima la batteriolisi, depone in favore per una identificazione delle sostanze termostabili cogli ambocettori; ed ugualmente favorevoli sono i risultati dell'esperienza, esposta nella tabella seguente:

Tabella VI.

Esperienza XXII. — 20 luglio.

	Innesto dei germi	Dopo 30′	Dopo ore 3.30
A) Leucociti lavati e sospesi in soluzione fisiologica.	...	Moltissimi germi. Nessuna fagocitosi.	Moltissimi germi; non fagocitosi.
B) Leucociti lavati e sospesi in soluzione fisiologica. Batteri sensibilizzati con siero immune $^{1}/_{100}$ inattivato + siero di sangue normale attivo.	Moltissimi Ca 400.000	Scarsissimi batteri; fagocitosi vivissima.	Scarsissimi batteri in piccole catenelle.
C) Siero immune $^{1}/_{100}$ inattivato + siero di sangue attivo + leucociti.	...	Scarsissimi batteri, fagocitosi vivissima.	Nessun germe libero; alcuni granuli nell'interno delle cellule.
D) Siero immune $^{1}/_{100}$ inattivato + siero di sangue attivo, dopo aver servito alla sensibilizzazione dei batteri + leucociti.	...	Infiniti batteri, nessuna fagocitosi.	Aumento considerevole dei germi in catenelle; nessuna fagocitosi.

Da questa tabella risulta che la fagocitosi è vivissima, sia usando ambocettori + complemento + leucociti, sia usando leucociti lavati e sospesi in soluzione fisiologica ma con germi sensibilizzati per contatto di un'ora a temperatura ambiente con ambocettore + complemento; è invece assente, ove si usi il siero immune + siero attivo normale, che ha già servito alla sensibilizzazione dei germi, in cui cioè ambocettori e complemento sono stati tolti. Perciò il modo di legarsi da una parte ai batteri, dall'altra alla sostanza termolabile che completa la loro azione è del tutto identico negli ambocettori e nelle batteriotropine (od opsonine specifiche che dir si voglia).

Che poi tali sostanze agiscano modificando i germi e non stimolando l'attività fagocitaria dei leucociti (stimoline del Metscnikoff) è dimostrato dalla tabella seguente, ove è ripetuta la disposizione dell'esperienza secondo Ehrlich e Morgenroth, come fanno anche Neufeld e Rimpau. Cioè, sensibilizzando germi in siero immune inattivo ed aggiungendo successivamente siero normale + leucociti, la fagocitosi è vivissima; mentre sensibilizzando i leucociti e aggiunti poi a siero di sangue normale, la fagocitosi non è superiore a quella che si osserva usando leucociti non sensibilizzati:

TABELLA VII.

ESPERIENZA XXIII. — 18 luglio.

Innesto circa 300,000 germi.

	Dopo 30′:
A) Leucociti lavati e sospesi in soluzione fisiologica	Molti batteri non agglutinati; nessuna fagocitosi.
B) Leucociti come *A*. Batteri sensibilizzati in siero immune inattivo (1/100).	Molti batteri non agglutinati; discreta fagocitosi.
C) Leucociti tenuti a contatto con siero immune inattivo (1/100) e sospesi in soluzione fisiologica	Molti batteri non agglutinati; nessuna fagocitosi.
D) Siero di sangue normale + leucociti	Molti batteri non agglutinati; fagocitosi notevole.
E) Siero di sangue normale + leucociti. Batteri sensibilizzati	Batteri notevolmente diminuiti di numero; fagocitosi vivissima.
F) Siero di sangue normale + leucociti tenuti a contatto con siero immune inattivato (1/100).	Molti batteri non agglutinati; fagocitosi non più notevole che in *D*.
G) Siero di sangue immune inattivo (1/100) + leucociti	Batteri molto agglutinati; fagocitosi scarsa.
H) Siero di sangue immune inattivo + complemento + leucociti	Batteri diminuti di numero fortemente agglutinati; fagocitosi vivissima.

E' dunque ad una modificazione dei batteri che si deve l'esaltamento dell'azione fagocitaria dei leucociti. Che tale modificazione non debba identificarsi colla morte dei germi, come è già stato riconosciuto dal Neufeld e Rimpau per i diplococchi e gli streptococchi, risulta dal fatto, che se si uccidono col calore dei bacilli dissenterici, la fagocitosi manca, ove si usino leucociti sospesi in soluzione fisiologica: perciò anche qui possiamo completamente confermare gli AA. predetti.

Piuttosto noi crediamo che tale azione debba riferirsi alla neutralizzazione dei prodotti batterici che tengono lontani i leucociti (aggressine) (1).

Conclusioni.

1. Il decorso delle infezioni intraperitoneali della cavia dipende in un certo grado dalla individualità degli animali, ma le differenze non sono così grandi che non si possa fissare una dose letale, che uccida acutamente.

2. Nelle infezioni colerica e dissenterica anche acuta i germi non si moltiplicano affatto, o non in grado considerevole, ma spesso si conservano lungamente in vita; si tratta dunque piuttosto d'intossicazione che di infezione, la teoria che attribuisce la morte ad endotossine che debbono uscire dai cadaveri dei germi non è soddisfacente. Probabilmente i batteri viventi, dànno origine a sostanze tossiche.

3. L'assorbimento dei germi dal peritoneo nel sangue incomincia subito dopo l'infezione, ma non è mai considerevolo a paragone del numero dei batteri che restano nel peritoneo. Nel sangue crescono i bacilli del carbonchio, non quelli del colera e della dissenteria, cosicchè non si può parlare nel senso stretto di una infezione generale attiva.

4. In tutte le infezioni peritoneali studiate da noi abbiamo trovato dal principio una fagocitosi più o meno ricca da parte dei leucociti del liquido peritoneale o delle cellule fisse dell'omento. Più tardi nelle infezioni subacute (non letali) emigrano leucociti, che servono di nuovo come fagociti nell'essudato libero e nell'omento, Negli stadi avanzati delle infezioni acute (mortali) la fagocitosi può mancare perfettamente nell'essudato libero, anche se qui occorrono abbastanza leucociti (carbonchio), ma nell'omento esiste sempre leucocitosi (migrazione di corpuscoli bianchi dai vasi) ed anche fagocitosi.

5. I fagociti per lo più distruggono i germi inglobati nel loro interno, ma vi sono dei casi in cui questi si moltiplicano nelle cellule stesse.

6. Anche fuori delle cellule muoiono dei germi quasi in tutti i periodi dell'infezione, ma è difficile di apprezzare il numero relativo che soccombe in questo modo, le forme degenerative chiare essendo

(1) Vedi Pane e Lotti, loc. cit.

spesso abbastanza scarse. Le proprietà antibatteriche del liquido peritoneale normale e del siero essudato durante l'infezione spiegano abbastanza l'arresto di sviluppo e la distruzione extracellulare dei germi, che in quest'azione entrino anche delle sostanze leucocitarie, non possiamo decidere. Distruzione di leucociti (leucolisi) vi è forse sempre, ma non si riesce ad estrarre dai leucociti sostanze battericide. Al più si osserva arresto di sviluppo in liquidi che contengono molti leucociti senza presentare fagocitosi.

7. I leucociti in soluzioni indifferenti non sono affatto capaci di fagocitare (bacilli dissenterici), lo sono bene in siero di sangue o liquido peritoneale normale od in siero immune inattivato, benissimo in siero normale con aggiunta di siero immune. Non si tratta d'influenza diretta stimolante dei liquidi organici sui leucociti, ma di un'azione sui batteri (opsonine o batteriotropine in senso largo).

La malaria in Italia durante il 1906

Ricerche epidemiologiche e profilattiche

Riassunto di A. CELLI.

Le stazioni per lo studio epidemiologico e profilattico della malaria in Italia, durante il 1906, furono anche più numerose che negli anni precedenti (1) in ispecie nel Mezzogiorno e nelle Isole.

Nel volume VIII degli Atti della Società vengono pubblicate le *relazioni speciali* dei seguenti autori:

Per l'*Italia superiore*: dottori Vaccino N. ed A. (Vercellese); dottore Omodei-Zorini (Lomellina); prof. Bordoni-Uffreduzzi e dott. Bettinetti (Milano); dott. Polettini (Veronese); dott. Soliani (Mantova);

Per l'*Italia media*: dott. Orta (Ferrarese); dott. Pasquini (Toscana); dott. Boccanera e medici comunali (Agro Romano); dottori Tafuri, Falcioni e Pozzilli (Bassa valle dell'Aniene);

Per l'*Italia meridionale*: prof. Rossi, dott. Guarnieri e molti medici del Mezzogiorno continentale; dott. Tanzarella (Terra di Bari); Comitato antimalarico calabrese;

Per la *Sicilia*: Croce Rossa e vari medici; ing. Sbacchi (Ferrovia sicula occidentale);

Per la *Sardegna*: prof. Casagrandi e vari medici della provincia di Cagliari; dott. Meloni-Satta (Ferrovie reali sarde); dott. Varese (Ferrovie secondarie sarde); dott. Frongia (Miniere);

Da un estremo all'altro d'Italia: Direzione generale delle gabelle, per le guardie di finanza; Direzione sanitaria delle ferrovie di Stato; Ispettorato di sanità militare per l'esercito.

---

(1) V. questi Annali, vol. XII-XVI, 1901-1906.

Nello stesso volume VIII sono pubblicate le *relazioni su temi generali*, come quelle sulla terzana e quotidiana estivo-autunnale e sull'emoglobinuria da malaria (prof. Carducci); sul tannato di chinina (professori Concetti, Gaglio, Celli e dott. Flamini).

Con la preziosa collaborazione del dott. Th. De Vogel per le Indie Olandesi, del dott. Vassal per l'Isola della Reunione, del dott. Wellmann per l'Africa Portoghese, dei fratelli Sergent per l'Algeria, del dott. Rousseff per la Bulgaria, dei colleghi della Società per gli studi della malaria in Grecia (prof. Savas, dott. Cardamatis, Pezopoulos, ecc.) nonchè del dott. Schiavuzzi pel littorale adriatico austriaco, possiamo anche in quest'anno fare utilissimi confronti internazionali.

Rimandando il lettore alle singole monografie (1) degli egregi soci della nostra Società, esporrò, secondo il solito, qui in breve *quanto per sè e come termine di confronto è più necessario a conoscersi e di più importante accadde nello scorso anno 1906 intorno alla epidemiologia ed alla profilassi della malaria.*

PARTE I.

Epidemiologia della malaria.

1. — Aumento generale dell'epidemia.

L'annata epidemica del 1906 fu assai mite, non solo in tutta l'Italia superiore, centrale adriatica, e insulare, dove anche la precedente fu mite, ma eziandio nel Lazio e nel Mezzogiorno, dove l'epidemia nel 1905 fu generalmente di intensità elevata.

Per tutto il campo di osservazione dei nostri soci, soltanto nei comuni di Palizzi in Calabria e Siliqua in Sardegna, l'epidemia sarebbe stata più grave che nell'anno antecedente.

Per quanto però fosse un'annata di epidemia lieve, si potè in più luoghi constatare come più lieve ancora o quasi nulla fu dovunque assidua ed energica si svolge da anni l'azione antimalarica dei soci nostri.

Di *confronti internazionali* abbiamo che, al contrario di quanto avvenne in Italia, fu nell'Algeria più grave la malaria che nel 1905.

Invece nella Grecia fu, come da noi, più mite che nel 1905, ma complessivamente sempre ancora più grave che da noi.

---

(1) V. Atti della Soc. per gli studi della malaria, vol. VIII, 1907.

Dalla Bulgaria cominciamo ad apprendere che dal 21 al 39 % dei malati di certi ambulatori, e dal 10 al 12 % degli infermi di ospedale sono malarici.

Nell'Africa Portoghese, secondo il dott. Wellmann, circa metà della popolazione è colpita dalla malaria, e quindi molto meno che lo era da noi in certi anni e in certe regioni.

Il dott. Vassal descrive, nelle Isole Reunione e Maurizio, un'epidemia di malaria grave, con 34 ‰ di mortalità e 66-77 % di scarti di leva.

***

Qualche sprazzo di luce comincia a rischiarare la *storia della malaria nei tempi passati.*

E' noto che Ippocrate (1) descrisse tutte le forme di febbre malarica, comprese le perniciose e le cachessie. E poichè attorno all'antica Atene le paludi e le acque stagnanti non scomparvero mai, così è da ritenere che ivi, come attorno all'antica Roma e all'antica Ravenna (2), come nella nostra magna Grecia, la malaria dovette subire una grande, spontanea attenuazione, ad aumentar la quale e a consolidarla concorsero le opere di quelle grandi civiltà, e specialmente l'agricoltura intensiva. Ma quando poi questa fu abbandonata, quella riacquistò il suo dominio e più o meno ve lo mantenne insino ai nostri giorni.

E' assai probabile però che siano avvenute eziandio nell'evo medio e moderno grandi attenuazioni periodiche.

Ad esempio l'Istria (3) fu di certo libera dalle febbri nell'epoca bizantina, quando, pur essendo sempre in mezzo a paludi, ne era libera o quasi anche Ravenna (4).

Così nell'Agro Romano, dai tempi di papa Zaccaria (anni 741-752) fino alle scorrerie dei Saraceni (anno 846-876), corse un buon secolo di vita agricola rigogliosa, come non si ebbe mai più.

Anche ai tempi di Leone X (5) « si godè in questo clima un ordine felice di stagioni ed una quasi insolita bontà d'aria ». E, venendo ad epoche più recenti, la provincia di Reggio-Emilia, secondo autorevoli testimonianze (6), raggiunse nel secolo XVII il massimo splendore agricolo-commerciale ad onta del sempre superstite paludismo. Mentre nel secolo successivo il Torti nella provincia limitrofa di Modena potè compiere i famosi studi sulla malaria, e descrivere anche tutte le possibili forme di infezione perniciosa.

Similmente, qui nell'Agro Romano, vecchi edifizi rurali ancora stanno

---

(1) V. Atti, vol. VIII, memoria del prof. SAVAS.
(2) V. Atti, vol. IV, 1903, memoria del dott. CHIGI.
(3) V. Atti, vol. VIII, memoria del dott. SCHIAVUZZI.
(4) V. CHIGI. Loc. cit.
(5) NICOLAI. *Memorie, leggi, ecc., sulla campagna romana.* Parte III, Roma, 1803.
(6) V. Atti, vol. VIII. Memoria del prof. ROSSI.

a ricordarci le grandi colonizzazioni intraprese in tempi di relativa attenuazione, e poi dovute abbandonare in tempi di recrudescenza dell'epidemia.

Cosicchè possiamo dire che furono sempre in vigore le *leggi delle attenuazioni e recrudescenze periodiche*, delle quali avremo più sotto occasione di trattare (v. a pag. 446-47, fig. 1, 2 e 3).

Un fatto nuovo però è sopraggiunto; che cioè scoperte le cause prime dell'epidemia e utilizzandone meglio i rimedi, possiamo dominarla più prontamente, più direttamente, più stabilmente che per lo passato.

***

In ordine ai *vari indici misuratori dell'intensità epidemica* è bene tener conto eziandio della mortalità riferita non solo alla intiera popolazione (mortalità propriamente detta), ma eziandio al rispettivo numero dei colpiti (perniciosità o letalità).

Ad esempio negli ospedali di Roma ne muore ancora 1 su 143 malarici, mentre 1 su 176 ne muore negli ospedali di Grecia; in questi dunque la letalità per malaria è del 5.68 ‰ colpiti; in quelli di Roma è del 7 ‰.

Nè deve esser mai trascurato l'*indice clinico*, pel quale sappiamo che nei luoghi e nei tempi di malaria mite, come l'anno scorso, prevalgono le infezioni con sintomi lievi, di breve durata e facilmente accessibili al chinino; e viceversa nei luoghi e tempi di malaria intensa prevalgono le infezioni con sintomi gravi, complicanze e successioni morbose, nonchè ostinatamente ribelli all'azione chinacea.

Quanto all'*indice megalosplenico*, che è un facile ma non esclusivo misuratore di un'epidemia, il Wellmann trova che se arriva al massimo (più del 60 %) nell'età di circa 3 anni, si riscontra però eziandio dopo i 20 a 25 anni.

Cosicchè riassumendo e concludendo (1) su questo argomento, *gli indici misuratori di un'epidemia di malaria sono molteplici*, e cioè:

morbosità infantile e relativa splenomegalia;

morbosità riferita a tutta la popolazione, ovvero ad una determinata parte (agricola, mineraria, militare);

mortalità riferita a tutta la popolazione (mortalità propriamente detta) ovvero al numero dei colpiti (perniciosità o letalità per malaria);

---

(1) V. anche i miei precedenti rapporti in questi Annali, vol. XV e XVI, 1905 e 1906.

recidività o meno;

rapporto fra le febbri estivo-autunnali e quelle terzanarie lievi;

decorso clinico più o meno grave e relative complicanze (emoglobinuria, ecc.);

epidemie domestiche ovvero casi sporadici.

Soltanto *se tiensi conto di tutti questi indici misuratori si può esattamente d'anno in anno misurare l'andamento dell'epidemia e far confronti internazionali precisi.*

A questo proposito il prof. Savas tende a togliere dall'Italia e gettar sulla Grecia il triste primato della malaria in Europa.

Purtroppo dal Lazio a tutto il Mezzogiorno continentale e insulare non si poteva dire che ancora attorno al 1900 non ci appartenesse; ma è certo che in questi ultimissimi anni ce ne stiamo liberando, e confidiamo se ne potrà liberar presto anche la nostra nazione sorella.

2. — Etiologia. Distribuzione geografica dei parassiti malarici.

Il dott. Carducci riprendendo lo studio della quotidiana vera (Marchiafava e Celli), ha trovato che morfologicamente il parassita non sarebbe diverso da quello della terzana maligna, e solo con una sua doppia generazione darebbe la forma clinica di quotidiana vera, la quale nelle recidive presentasi più spesso che nelle primitive infezioni.

Per lo scorso anno la seguente

TABELLA I.

Località	Terzana grave		Terzana lieve		Quartana		Proporzione fra la terzana grave e la lieve	Osservazioni
	Totale	%	Totale	%	Totale	%		
Vercellese	2	2.35	82	96.47	1	1.17	1:41.00	
Candia Lomellina	0	..	..	..	0	..	..	Tutte terzane lievi.
Veronese	31	15.97	131	67.52	32	16.49	1: 4.22	
Mantova	2	5.55	31	86.11	3	8.33	1:15.50	
Ferrarese	33	13.25	188	71.50	28	11.24	1: 5.69	
Agro Romano	37	68.51	15	27.77	2	3.70	1: 0.40	
Terra di Bari	85	52.14	57	34.96	21	12.88	1: 0.67	
Sardegna	1015	43.10	1343	57.10	212	8.98	1: 1.32	
Grecia	148	62.18	87	36.55	3	1.26	1: 0.58	
Africa Portoghese	285	95.32	0	..	14	4.68	1: 0.00	Nessuna terzana lieve.
Isola Reunione	168	63.63	85	32.19	11	4.16	1: 0.51	

dimostra che pur essendo un anno di epidemia leggiera, ciò non di meno fu alta la proporzione di terzana grave nell'Agro Romano e in Terra di Bari; quindi *il pericolo di nuove e gravi epidemie è tutt'altro che rimosso e remoto* se non si continua a tenerlo soffocato.

Nell'Italia superiore l'attenuazione ha progredito al punto che in alcuni luoghi la terzana lieve ha un assoluto predominio.

In Sardegna dove domina la terzana grave e dove la terzana lieve: questa intanto ha preso il sopravvento in complesso per tutta l'isola, ed anche in alcuni luoghi ove quella dominava. Ciò dà molto a sperare pel risanamento dell'isola.

Invece fra l'Agro Romano, la Terra di Bari, la Grecia e l'Isola Reunione la distribuzione geografica dei parassiti malarici è poco differente.

L'Africa Portoghese ci offre un esempio di assenza della terzana lieve, come l'Africa tedesca (A. Plehn, Ziemann).

3. — Recidività delle febbri da malaria. Infezione latente.

Sempre alla scopo di conoscere un *mezzo diagnostico della malaria latente* il Casagrandi e il De Blasi ognuno da un diverso punto di vista hanno continuato le loro difficili ricerche.

Nulla sapendosi ancora intorno alla costanza ed alla specificità delle emolisine coctostabili, che il Casagrandi estrasse con alcool dal *siero* di sangue dei malarici, e delle emolisine intracellulari, che il De Blasi ricavò dissolvendo in acqua distillata i *corpuscoli rossi*, si è pensato di ricorrere ad altri procedimenti, intesi a ricercare la presenza di corpi specifici o quella di antisostanze in genere, dimostrabili col metodo della sottrazione o deviazione, come anche si dice, del complemento, secondo Bordet e Gengou. A nessuno può sfuggire la difficoltà di ricerche così complesse, il cui esito può essere, per cause d'errore diverse e non tutte conosciute, o turbato in modo da non potersi riconoscere delle antisostanze effettivamente presenti, o mentito in guisa da potersi credere alla presenza di antisostanze, che in realtà non esistono.

Non è perciò da meravigliare che tali studi non ci abbiano ancora fornito alcuna conclusione sicura; è lecito però sperare che, continuati e ripetuti e vagliati con accortezza e giudizio, potranno farci conoscere dei fatti suscettivi di un'utile applicazione pratica.

Lo *studio del problema della recidività*, che i malariologi stranieri così spesso trascurano, fu istruttivo di parecchi insegnamenti anche in un anno di malaria così mite come fu il 1906.

Ad esempio a Vigasio, con la solita esemplare diligenza, il dott. Polettini mise in evidenza che *mancò la recrudescenza prepidemica* così ca-

ratteristica negli anni di malaria grave, e similmente il decorso clinico fu mitissimo in tutto il primo semestre. Si esacerbò invece nell'agosto e settembre quando si ebbe la sola e breve raffica dell'epidemia.

In relazione alle *forme o specie parassitarie* recidivarono più ostinatamente la quartana in ragione del 56 %, e poi la terzana lieve in ragione del 49 % e per ultima (come avvenne anche ad Argenta) la terzana grave in ragione solo del 23 %.

Questa *diversa resistenza e persistenza delle varie forme parassitarie* ci spiega come e perchè, quando la malaria si attenua o si estingue, la prima a scemare e poi a scomparire sia la terzana grave, e le ultime a cedere siano la terzana lieve e la quartana.

Quanto all'*età* recidivarono ad onta della cura assidua i bambini in proporzione del 38 % e gli adulti e ragazzi in ragione del 51-52 %. Il che prova come *l'età non è di per sè causa predisponente alla recidività* quando la cura specifica intervenga così attivamente come a Vigasio.

Dove la malaria tende a scomparire per così alto merito dell'uomo, come a Pontepossero, degli 84 malarici che residuavano dalla fine della campagna del 1905 recidivarono soltanto 11 (13.1 %).

Nei minatori sardi invece l'indice della recidività fu più alto che fra gli agricoltori dello stesso territorio.

E', infine, da ricordare che secondo un'accurata relazione del dott. Montano (1), fra i nostri emigranti per l'America si avrebbe in rapporto alla stagione un modo di comportarsi delle recidive malariche nei viaggi verso il Sud diverso da quello nei viaggi verso il Nord; cioè in questi il massimo numero delle recidive fu nei mesi dal settembre al dicembre, in quelli invece fu nei mesi di marzo-aprile e di agosto-settembre. Così notevole differenza non può senz'altro ascriversi alle condizioni fisiche, metereologiche e ai raffreddamenti.

Ad ogni modo pei nostri emigranti risulta che il *viaggio in mare predispone chi non vi è abituato alla recidività*.

***

Il prof. Carducci ha nuovamente studiato le *complicazioni e successioni morbose*.

E ancora una volta ha confermato come le complicazioni a carico del sistema nervoso, che prima si ritenevano proprie soltanto delle forme estivo-autunnali, possono eccezionalmente accompagnare anche le forme primaverili.

L'emoglobinuria può qualche rara volta accompagnar la quartana, ma non la terzana lieve. Di solito però è notoriamente legata alla terzana grave.

---

(1) Statistica degli emigranti curati durante l'anno 1905 nelle infermerie di bordo. Annali di medicina navale, anno XII, 1906.

4. — Decorso annuale delle febbri recidive e primitive. Tipi epidemici.

Incominciamo ad avere notizie dei *tipi epidemici predominanti nella Grecia.*

Quivi, se tiensi conto insieme dei casi tutti, recidivi e primitivi, ne risulterebbe un tipo epidemico col minimo in febbraio e il massimo in luglio e agosto.

Che se tiensi conto dei soli casi di primitiva infezione, se ne trovano in maggio 1.62 %, in giugno 13.33 e in luglio 85.03; quindi si avrebbe un *tipo epidemico molto simile al nostro Nord Italia* (1). E al solito, come da noi negli anni di più grave epidemia, è la terzana lieve che inizia nel maggio la nuova epidemia.

A sua volta il dott. Schiavuzzi ha instituito il *confronto del tipo epidemico mensile della malaria con quelli della tifoide e della dissenteria*, che sono altrettante epidemie estivo-autunnali.

E per l'Istria ne risultano delle curve così differenti che confermano come se queste infezioni possono coincidere in ordine di tempo, e talvolta complicarsi nell'istesso infermo, conservano però il loro tipo epidemico diverso come n'è diversa la causa specifica.

Da noi si ebbe ad osservare che nel Veronese *mancata la recrudescenza preepidemica delle recidive anche le nuove infezioni apparvero in ritardo;* però, prima fu sempre la terzana lieve nel luglio, e, come per le recidive, la vera sia pur mite epidemia fu nell'agosto, e alla metà di ottobre era sul finire.

Anche in un'annata buona come il 1906 il numero dei nuovi colpiti fra gli indenni fu sempre notevole; difatti il 57 % degli immigrati da regioni salubri, e il 39 % di bambini nati nell'anno pagarono il loro tributo alla febbre.

E in generale rispettivamente all'età furono colpiti i bambini in ragione del 7.85 %, i ragazzi del 5 %, gli adulti del 3.6 %.

Nel Barese infine, dove per la prima volta il dott. Tanzarella ha studiato l'epidemia, questa si mantenne in circoscritti focolai domestici senza diffondersi fra la popolazione. E al solito prima a comparire fu la terzana lieve, poi venne la estivautunnale e in ultimo la quartana. *Si confermarono dunque i soliti nostri tipi epidemici.*

---

(1) V. questi Annali, vol. XII, 1902.

6. — Vita delle zanzare in rapporto con l'epidemia di malaria.

Nuove ricerche sono venute ad illustrare la vita acquatile delle anofeline.

Ad esempio il Frongia ha osservato che le acque dei bacini di decantazione delle miniere contenenti minerali di Pb e Zn nonchè impedire favoriscono la vita acquatile delle anofele e così mantengono un paludismo favorevole allo sviluppo della malaria.

Dicemmo già (1) come il De Vogel nelle Indie Olandesi aveva osservato l'adattamento di due specie a resistere nelle acque marine esiandio molto salate.

Invece anche colà una specie molto vicina alla nostra macolipenne non resiste in acqua di mare.

Finalmente in Grecia il dott. Cardamatis confermò che, come in Italia, le acque salate non sono le più propizie alla vita acquatile delle nostre anofeline.

In Grecia si trovano del resto, come da noi, le specie di anofeline *claviger*, *superpictus*, *bifurcatus*; nei dintorni di Atene vive solo il *superpictus* che da noi pure si trova, e talora predomina nell'Italia meridionale: in altre regioni della Grecia invece, come da noi, predomina il *claviger*.

Sinora non venne rintracciato il *pseudopictus* che da noi si incontra nell'Italia media e superiore.

Com'è noto, la fauna anofelica è diversa e generalmente più abbondante nelle regioni tropicali; per esempio nell'isola della Reunione e di Maurizio il Vassal ha trovato: *Myzorhynchus Constani* e *Pyretophorus costalis;* nell'Africa portoghese il Wellmann indica ben 8 specie di anofeline; cioè *Anopheles*, *Myzomyia*, *Pyrotophorus*, *Cellia*, *Myzorynchus* e *Nyssorynchus*.

Mà fra tutte, la più importante propagatrice di malaria è la *Myzomyia funesta* (Giles) e poi viene il *Pyrotophorus austeni*.

Qui in Italia nel 1905 una diminuzione di anofele aeree, ad onta del sempre esteso paludismo dei limitrofi laghi, si sarebbe osservata a Mantova. Qualcosa di simile si sarebbe osservato ad Argenta.

Finalmente in Grecia il dott. Cardamatis notò una più facile degenerazione delle anofele negli anni 1902, 1903, 1904, e, al contrario, una rivificazione delle loro generazioni nel 1905, quando si ebbe, come vedremo, una delle solite, regolari recrudescenze periodiche.

---

(1) Questi Annali, vol. XVI, 1906.

Queste prime osservazioni sono ancora però troppo incomplete per poterne dedurre se qualche legge insita nella biologia stessa delle zanzare contribuisca a regolare l'andamento periodico dell'epidemia.

E infine nell'Algeria i fratelli Sergent hanno confermato che, come fin dal 1900 (1) fu da noi osservato, al di là di 200-350 m. circa le zanzare non volano; e a maggiori distanze emigrano passivamente cioè attaccandosi agli animali, all'uomo e ai veicoli, ai prodotti del suolo, e agli oggetti d'uso.

Ed è così che nella Sardegna i focolai anofelici si riscontrano non solo per le campagne deserte, ma eziandio presso e nell'interno degli abitati, come negli abbeveratoi, nelle vasche degli orti, in ogni raccolta d'acqua.

Fortunatamente però *il fausto evento dell'anofelismo senza malaria può accadere, e sempre più accade anche nel nostro Mezzogiorno.*

7. — Rapporto tra le infezioni degli anofeli e l'epidemia di malaria.

In Grecia il dott. Cardamatis ha confermato che le anofeline anche infettate in autunno non riescono a trasmettere la infezione malarica nell'inverno, e molto meno ancora da un anno epidemico all'altro.

E a lor volta i fratelli Sergent non più del 4 % di zanzare infette riscontrarono in Algeria.

Entrambi gli AA. confermano quindi le osservazioni del nostro Martirano.

8. — Agricoltura e malaria.

I fratelli Sergent in Algeria confermarono che l'agricoltura intensiva fa retrocedere la malaria, e viceversa le foreste in pianure paludose contribuiscono a trattenere e diffondere il virus. Lo stesso dicasi dei lavoratori avventizi e mobili da un luogo all'altro, come nelle zone del nostro latifondo. A sua volta però l'agricoltura intensiva, come quella irrigua degli ortaggi, può mantenere (ad es. nel Barese) un anofelismo pel quale la malaria serpeggia dappertutto, dalle campagne fino ai più grossi centri di popolazione.

Fra i lavoratori di risaia, nella mondatura, il dott. Omodei-Zorini descrive una *dermatite papulo-vescicolosa e talora pustolosa del collo, dorso e spazio interdigitale del piede sinistro, e dello spazio interdigitale della mano destra.*

---

(1) V. Atti, vol. II, 1901, Memoria del dott. Ficacci.

Si sviluppò in forma epidemica (su 300 mondariso circa) e obbligò di sospendere il lavoro.

La suddetta localizzazione ha forse origine nella speciale posizione del piede sinistro che procede in avanti per tracciare la via, e della mano destra che sta nell'acqua a livello del terreno.

Ad ogni modo questa dermatite è diversa da quella eritematosa che abitualmente si verifica a termine di stagione e colpisce a preferenza la pelle delle gambe nelle loro parti sommerse in acqua delle risaie.

9. — Altre cause predisponenti o non all'epidemia di malaria.

Quanto alle *condizioni organiche* il dott. Vassal dimostra, per l'Isola di Reunione e Maurizio, come la malaria, invadendo per la prima volta una popolazione che prima ne era indenne, fa stragi paragonabili colle più terribili pestilenze tropicali (colera, febbre gialla e peste bubbonica).

In pochi anni un quarto degli indigeni ne fu ucciso.

A lor volta i fratelli Sergent posero in evidenza come nella razza bianca naturale di Barberia a differenza che nella nostra, i parassiti permangono nel sangue periferico eziandio cessata la febbre.

Non c'è poi dubbio che anche in Grecia una certa immunità si sviluppi consecutivamente alla malaria sofferta e si confermi col crescere dell'età. Ma, come da noi, se il massimo numero di infetti si ha da 1 a 10 anni, la infezione, sia pure declinando col crescere degli anni, prosiegue a colpire fino alla tarda vecchiaia, e quindi non i bambini sono esclusivamente (Koch e altri autori) o quasi i serbatoi del virus.

Quanto ai *rapporti fra metereologia e malaria*, l'umida stagione primaverile, il calore abbastanza intenso e prolungato, e l'autunno tepido fino ai primi del dicembre avrebbero dovuto favorire l'epidemia, che invece fu assai mite.

In Grecia si nota che i cambiamenti metereologici dai tempi antichi si mantengono gli stessi, onde una certa stabilità del clima che non si concilia con le variazioni annue e periodiche dell'epidemia, e con le notevoli differenze che, come in Italia fra il nord e sud, colà si osservano fra la zona occidentale e quella orientale, nella prima con una morbosità del 5-10% della popolazione e con la forma clinica più benigna, e invece nella seconda zona con una morbosità del 15-80 % e con forme cliniche più gravi. Le eccezioni a questa regola che si verificano nell'uno o nell'altro dei due territori, contradicono eziandio alla predominanza che alcuni vorrebbero attribuire alle condizioni metereologiche nel regolare lo sviluppo dell'epidemia.

I rapporti fra industria e malaria furono nuovamente indagati dal dott. Frongia per le miniere di Sardegna, ove si confermò che la malaria fra i minatori è più estesa e più intensa che fra i contadini del medesimo distretto.

Ad esempio la morbosità per malaria fu 15-31 % della popolazione totale, 30 % minatori, e solo 4 % contadini; fra quelli l'acme dell'epidemia fu in agosto, fra questi in settembre; nei primi anche le forme cliniche furono più gravi che nei secondi.

Forse a tutto ciò contribuisce un particolare stato di anemia consecutiva alla sia pur lieve intossicazione sarturnina, abbastanza frequente fra gli operai di quelle miniere piombifere.

Nel Vercellese la mitezza dell'epidemia fu attribuita all'aver limitato il lavoro in risaia a sole 8 ore e insieme all'avere abolito il sopralavoro complementare; onde avvenne che pochissime delle mondariso divennero anemiche e dismenorroiche, come prima accadeva di frequente.

Si deve poi non omettere che il 1906 fu un'annata di raccolti buoni per tutta Italia, eccezionalmente buoni per la Sardegna.

Quindi fu meno attivo quel fattore epidemico predisponente qual'è la miseria alimentare.

10. — Andamento periodico dell'epidemia di malaria. Sue recrudescenze ed attenuazioni.

E' notissimo che tutte le malattie diffusibili così tra le piante come tra gli animali sono soggette a periodiche oscillazioni, e che la malaria non sfugge a questa legge biologica generale.

In tutte le epoche la storia (v. pag. 433) ci lasciò memorie di simili eventi che gli antichi attribuirono a un genio epidemico.

Ma negli ultimi tempi, da quando cioè si raccolgono regolarmente le statistiche della mortalità e morbosità per malaria, noi possiamo studiare più da vicino un fenomeno così interessante dal punto di vista scientifico e pratico.

La tabella 2 ci dà pei singoli compartimenti, per tutto il Regno, e separatamente per l'Italia superiore, media (eccetto il Lazio), pel Lazio, per l' Italia meridionale continentale e per l' Italia insulare il numero dei morti per malaria e cachessia palustre, anno per anno dal 1887 a tutto il 1906 secondo la nostra Direzione generale di Statistica.

TABELLA

Morti di febbri di malaria

Compartimenti	1887	1888	1889	1890	1891	1892	1893	1894
Piemonte	526	378	348	320	337	366	277	203
Liguria	37	24	31	21	27	22	20	23
Lombardia	440	355	372	367	365	436	376	30[illegible]
Veneto	504	472	424	331	386	386	399	414
Emilia	303	228	228	234	294	243	291	219
Toscana	270	290	344	385	408	337	265	29[illegible]
Marche	55	63	58	45	45	33	35	42
Umbria	68	63	89	88	64	56	48	45
Lazio	883	985	969	1,041	1.233	965	951	843
Abruzzi e Molise	1,912	1,153	1,048	862	1,537	988	793	692
Campania	1,883	1,617	2,066	1,803	2,124	1,689	1,401	1,256
Puglie	2,721	1,606	1,567	1,759	2,266	2,156	2,286	2,956
Basilicata	1,345	690	826	961	1,297	995	995	984
Calabrie	2,448	1,953	1,711	1,978	1,944	1,664	1,664	1,649
Sicilia	5,404	4,008	4,013	3,211	3,794	3,352	3,822	4,481
Sardegna	2,234	2,102	2,100	2,241	2,108	1,843	1,713	2,013
Regno	**21,033**	**15,987**	**16,194**	**15,647**	**18,229**	**15,531**	**15,301**	**15,296**
Italia superiore	1,507	1,229	1,175	1,039	1,115	1,210	1,072	931
Italia media (eccetto il Lazio)	696	644	819	752	811	669	639	597
Lazio	883	985	969	1,041	1,233	965	951	843
Italia meridionale	10,309	7,019	7,218	6,363	9,168	7,492	7,139	6,728
Italia insulare	7,638	6,110	6,113	5,452	5,902	5,195	5.535	6,494

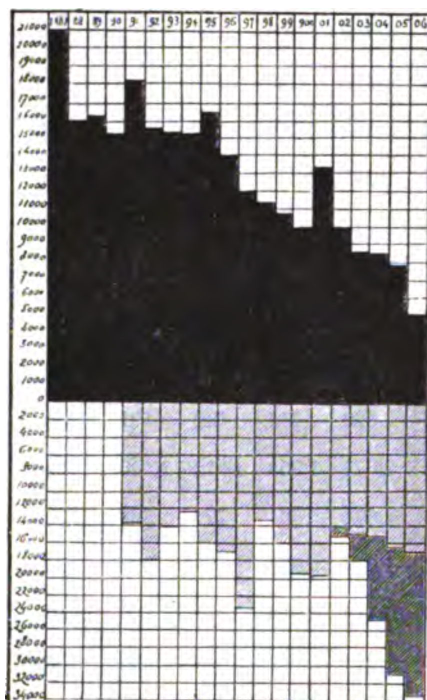
II.

› *cachessia palustre.*

1895	1896	1897	1898	1899	1900	1901	1902	1903	1904	1905	1906
190	188	154	159	162	145	129	74	70	62	48	29
24	18	14	7	14	7	10	12	6	7	6	6
269	252	256	283	288	224	221	172	109	89	73	64
357	328	341	289	281	291	261	164	123	113	112	95
181	207	199	241	201	213	194	143	119	72	82	38
271	211	172	224	196	204	287	147	81	48	69	70
39	39	22	26	33	30	26	13	13	12	15	9
51	53	26	21	31	40	27	11	12	9	12	8
869	672	448	560	529	724	470	324	284	261	302	214
1,051	830	639	550	385	696	575	529	648	548	431	156
1,867	1,625	1,150	1,045	800	1,177	722	522	415	542	591	274
2,596	2,455	1,916	1,688	1,455	2,862	2,981	2,071	1,906	1,912	1,540	799
1,454	1,069	819,	640	543	1,144	867	694	564	777	828	309
1,361	1,328	1,205	1,088	1,030	1,738	1,517	1,056	838	656	730	472
3,810	3,461	2,668	2,559	2,714	4,074	3,576	2,744	2,278	1,956	1,746	1,610
2,074	1,287	1,918	1,998	2,149	2,206	1,595	1,232	1,051	1,399	1,260	733
16,464	**14,023**	**11,947**	**11,378**	**10,811**	**15,865**	**13,558**	**9,908**	**8,517**	**8,463**	**7,845**	**4,886**
842	780	765	738	745	667	621	422	208	271	239	194
542	510	419	512	461	577	534	314	225	141	178	115
869	672	448	560	529	724	470	324	284	261	302	214
8,329	7,307	5,729	5,011	4,213	7,617	6,662	4,872	4,371	4,435	4,130	2,020
5,884	4,748	4,586	4,557	4,863	6,280	5,171	3,976	3,329	3,355	3,006	2,343

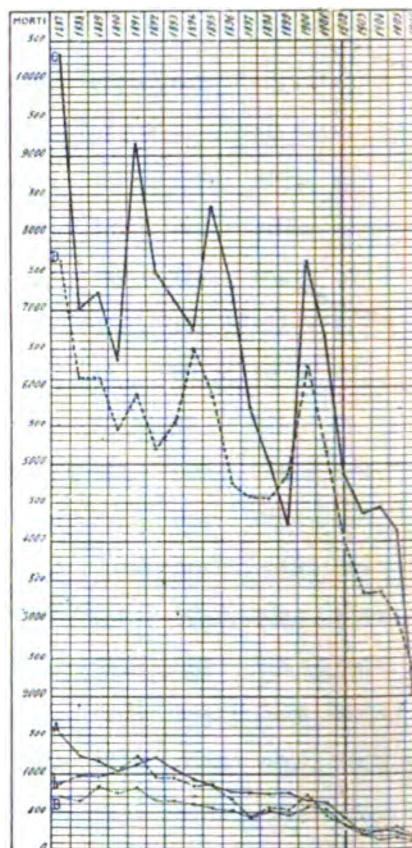
La fig. 1 colla sua parte superiore ci dimostra l'andamento di questa *mortalità* per tutto il Regno; la fig. 2 scinde e ci mette sottocchio la mortalità stessa nelle diverse suindicate regioni, confer-

Fig. 1. — Mortalità per malaria e consumo del chinino in Italia.



Numero annuale dei morti per malaria dal 1887 in poi.
Kgr. di chinino importati annualmente per l'industria privata dal 1891 in poi.
Kgr. di chinino di Stato annualmente venduti dal 1902 in poi.

Fig. 2. — Mortalità per malaria nelle regioni d'Italia prima e dopo il chinino di Stato.

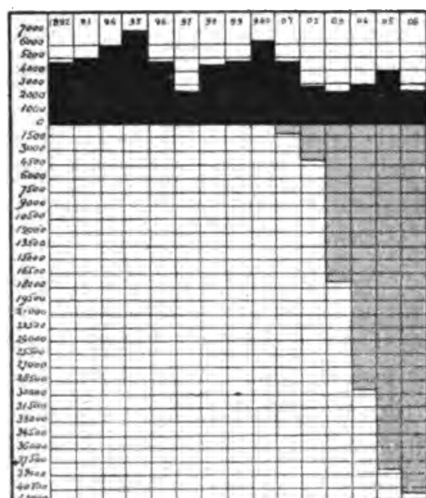


A —— Italia superiore.
B ········ Italia centrale (escluso il Lazio).
b -·-·- Lazio.
C —— Mezzogiorno continentale.
D ····· Sicilia e Sardegna.

mandoci la grande differenza delle due Italie malariche, l'una al sud, l'altra al nord; in quest'ultima, cioè al di sopra del Lazio, è notevole che la mortalità non solo è molto più bassa, ma segue una progressiva discesa senza periodiche esacerbazioni.

Similmente la fig. 3 colla sua parte superiore ci indica l'andamento della *morbosità* quale risulta dal numero degli infermi di malaria accolti negli ospedali di Roma.

Fig. 3. — Morbosità per malaria negli ospedali di Roma e profilassati col chinino nell'Agro romano.



■ Numero dei malarici ricoverati annualmente dal 1892 a tutto il 1906 negli ospedali di Roma.

☰ Numero dei profilassati col chinino di Stato nell'Agro romano.

Tutte le tre figure ci dimostrano un regolare avvicendarsi periodico di elevazioni e di abbassamenti: p. es., tra ogni massimo intercede un periodo di 4-5 anni per l'Italia meridionale, di 5-6 anni per l'Italia insulare, di 5 anni simmetricamente molto regolari per gli ospedali di Roma.

Ma non istiamo contenti alla semplice impressione.

Se facciamo il rapporto fra ciascun valore massimo e il suo precedente, avremo *prima del 1902*:

Per l'Italia meridionale

$$\frac{9168}{10209} = \frac{88.6}{100} \qquad \frac{8329}{9168} = \frac{90.7}{100} \qquad \frac{7617}{8329} = \frac{91.4}{100}.$$

Per l'Italia insulare

$$\frac{6494}{7638} = \frac{85.0}{100} \text{ circa} \qquad \frac{6280}{6494} = \frac{96.7}{100}.$$

Finalmente per gli ospedali di Roma *fino al 1900* abbiamo:

$$\frac{6187}{6947} = \frac{87.6}{100}.$$

Questi rapporti oscillano dunque entro limiti così vicini, che possiamo prendere come media approssimativa il valore di $\frac{90}{100}$, il quale ha tanto maggiore importanza, in quanto che risulta così dalla mortalità come dalla morbosità della malaria, e si deduce da tre grafiche differenti.

Anche in Grecia (1) la statistica delle cause di morte che si registrano dal 1899, ci indica una certa recrudescenza periodica, per cui una delle ultime più gravi epidemie fu quella del 1905, quando anche noi avemmo a soffrire la regolare recrudescenza come ci venne segnalata così da quei grandi osservatori della malaria che sono i nostri ospedali di Roma, come da alcuni nostri soci in alcune regioni d'Italia (ad esempio, il dott. Orta in Argenta), e come ci confermano le statistiche delle Ferrovie ex-adriatiche (v. tab. 6) e dell'esercito (v. tab. 14). Comunque, *le osservazioni metodiche della mortalità e* (dove è possibile) *della morbosità, concorrono ad ammonirci che le oscillazioni periodiche del genio malarico epidemico non sono accidentali, ma sembrano come regolate da una legge, la legge universale del ritmo,* che già la stessa esperienza popolare in luoghi di malaria aveva da un pezzo avvertita.

Difficile è indagare i fattori che riescono ad influenzarla. Possiamo però, in genere, ripetere che sono di ordine organico, fisico, economico.

Fra le cause organiche accenniamo a quella certa immunità temporanea della popolazione stabile consecutivamente all'epidemia sofferta; questo fatto risulta più evidente ove si può mettere a confronto la popolazione stabile con quella nomade o migratoria; in fondo si tratterebbe della legge di selezione naturale invocata dal Tommasi-Crudeli per spiegare come le antiche civiltà greche e romane contro la malaria ebbero a lottare ed a vincere.

Alle cause organiche si ricollegano quelle economiche, e fra di esse più in ispecie i raccolti, che con la loro vicenda influiscono sulla nutrizione popolare e quindi, in fondo, sulla stessa resistenza organica verso la invasione parassitaria.

Fra le cause fisiche, la climatologia — troppo ancora imperfetta — non ce ne rivela di quelle che agiscono così ciclicamente nei periodi generalmente quinquennali suaccennati. Comunque, le dette cause organiche e fisiche possono agire non soltanto sull'uomo, ma eziandio sulle anofeline.

---

(1) V. Atti, vol. VIII, Memoria del prof. SAVAS.

Per queste appena ora si accenna a degenerazioni periodiche (v. pag. 440) che subirebbero; però soltanto molti anni di studio potranno affermare o negare un fatto simile che avrebbe di per sè una primaria importanza.

Non devesi però dimenticare che il così detto genio epidemico potrebbe eziandio essere inerente a proprietà biologiche, protoplasmatiche, per le quali, *oltre al ciclo febbrile dimostrato dal Golgi per la terzana lieve e quartana, e dal Marchiafava e da me per la terzana grave, oltre al ciclo epidemico annuo da me dimostrato e da altri confermato per le stesse tre specie parassitarie, si avrebbe anche un ciclo epidemico periodico.*

Tutti e tre i cicli sarebbero di una regolarità sorprendente, appunto perchè dovuti anzitutto ad analoghe proprietà del protoplasma stesso dei parassiti specifici.

Soltanto però un lungo studio comparativo potrà risolvere questi problemi della più alta filosofia naturale e della più evidente importanza pratica.

11. — Conclusioni epidemiologiche.

L'annata epidemica del 1906 fu eccezionalmente mite per tutta Italia; ma dal Lazio a tutto il Mezzogiorno continentale mantennero sempre il predominio i parassiti della malaria grave, quindi il pericolo di nuova intensa epidemia è tutt'altro che rimosso.

Invece dove la malaria tende a scomparire spontaneamente, prendono e mantengono il sopravvento i parassiti della malaria lieve, ma sono essi gli ultimi a scomparire, perchè sono i più ostinati a recidivare.

Così in Grecia come in Terra di Bari vigono dei tipi epidemici analoghi a quelli già da noi descritti.

La fauna anofelica della Grecia è pure analoga a quella del nostro Mezzogiorno, dove altri felici esempi di anofelismo senza malaria si vennero riscontrando.

Si è confermato che le anofele non riescono a trasmettere l'infezione da un anno epidemico all'altro.

Sempre meno evidenti si mostrarono i rapporti fra meteorologia e malaria.

Seguendo invece per vari anni il decorso della mortalità e morbosità per malaria, si osserva che non sono accidentali ma sono regolate dalla legge del ritmo le oscillazioni periodiche dell'epidemia che gli antichi attribuivano al genio epidemico.

Sicchè, oltre al ciclo febbrile dei parassiti malarici, si ha il loro

ciclo epidemico annuo, e accanto a questo si avrebbe un loro ciclo epidemico periodico, non meno regolare degli altri due cicli.

Alle ricerche avvenire è riserbata l'ultima parola su questo e su altri argomenti ancora oscuri nel campo della epidemiologia.

PARTE II.

Profilassi della malaria.

Anche nel decorso anno 1906 fummo più specialmente occupati a diffondere la profilassi chininica e a metterla in confronto con altri mezzi di risanamento di un territorio della malaria.

Riferirò prima i risultati ottenuti, e poi ne ricaverò qualche conclusione.

A. — Chinino di Stato.

Il progresso di questa nostra provvida istituzione viene dimostrato dal consumo sempre ascendente del prezioso farmaco, il quale nelle sue varie forme (tavolette, confetti, fiale sterilizzate) da chili 2242 nel primo anno finanziario 1902-1903, salì a 7234 nel secondo anno, a 14,071 nel terzo, arrivò ai 18,712 nel quarto, e in quest'anno 1906-1907 toccò i 20,723.

I pregi ormai indiscutibili del grande rimedio di Stato, appena vengono conosciuti, abbattono ogni diffidenza ed ogni ostacolo che l'industrialismo tentò e tenta opporre alla marcia trionfale d'una istituzione ormai benedetta da tutta la nostra gente rurale.

Che si diffonda ovunque, in ogni angolo del nostro territorio, è questione di tempo e di organizzazione.

***

Nell'esercizio finanziario 1905-1906, la diffusione del chinino di Stato (1), secondo le regioni, fu come nella seguente

---

(1) Relazione del comm. SANDRI sull'azienda del chinino di Stato dal 1° luglio 1905 al 30 giugno 1906. Roma, 1907.

TABELLA III.

REGIONI	Consumo totale in chili	Consumo per abitante in grammi	Differenza dell' esercizio precedente
Piemonte	1,144.005	0.334	+ 0.085
Liguria	30.915	0.027	+ 0.008
Lombardia	1,450.665	0.325	— 0.031
Veneto	1,868.880	0.579	+ 0.214
Emilia	665.375	0.264	+ 0.013
Toscana	559.225	0.211	+ 0.101
Marche	70.570	0.064	+ 0.053
Umbria	58.460	0.084	+ 0.043
Lazio	2,614.060	2.016	+ 1.165
Abruzzi e Molise	659.395	0.446	+ 0.062
Campania	1,201.205	0.371	+ 0.056
Puglie	2,759.920	1.328	+ 0.182
Basilicata	1,001.405	2.041	+ 0.618
Calabrie	1,225.040	0.872	+ 0.173
Sicilia	1,947.625	0.522	+ 0.036
Sardegna	1,441.820	1.749	+ 1.298
Totale . . .	18,698.565	Media 0.554	+ 0.129

Anteriormente al 1° luglio 1905 i consumi della Lombardia comprendevano anche la quantità di chinino che l'Amministrazione delle ferrovie mediterranee acquistava per la distribuzione al proprio personale. Da quell'epoca in poi, istituitasi con sede in Roma la Direzione generale delle ferrovie dello Stato, i prelevamenti stessi sono andati ad aumentare il consumo del Lazio. Per cui a rendere omogenei i risultati, per poter fare una eventuale comparazione fra questo e l'esercizio precedente, occorre eseguire uno spostamento delle partite di cui trattasi (ascendenti a kg. 340), derivandone per l'esercizio 1904-1905 i seguenti risultati:

REGIONI	Consumo totale in chili	Consumo per abitante in grammi	Differenza dell'esercizio precedente
Lombardia	1,216.517	0.274	+ 0.051
Lazio	1,389.855	1.089	+ 0.927

Sicchè le regioni che consumarono *in totalità* più chinino di Stato, in ordine decrescente, furono le Puglie, la Sicilia, il Veneto, la Sardegna, il Lazio, le Calabrie, la Lombardia, la Campania; ma in rapporto *per abitante di singole regioni* furono la Basilicata, la Sardegna, le Puglie, il Lazio, le Calabrie, il Veneto e poi la Sicilia.

Da un esercizio finanziario all'altro la Sardegna, il Lazio, la Basilicata avanzarono sulle altre regioni.

Riportando il massimo consumo per *abitante di singole provincie*, si ha per Foggia gm. 2.9; per Sassari gm. 2.2; per Potenza e pel Lazio gm. 2.0; per Cagliari gm. 1.4; per Rovigo gm. 1.3; per Verona e Grosseto gm. 1.2; per Cosenza e Ferrara gm. 1.1; per Venezia, Lecce e Trapani gm. 1.0. Notisi che il solo comune di Roma ne consumò più di 300 chili.

Le cifre sopraesposte ci dicono che, *tenuto conto del bisogno, deve crescere ancora il consumo del chinino di Stato.*

E notisi pure che l'industria privata continuò presso a poco come prima nel commercio del chinino (v. fig. 1, parte media).

Ancora però *il chinino di Stato non arriva a tutta la popolazione che, per essere la più misera, non avea prima i mezzi di acquistarlo.*

Ed è più che mai *urgente la necessità di mettere in commercio un chinino di Stato non amaro, ad uso specialmente dei bambini.*

Da tre anni, com'è noto, proponemmo e proponiamo oggi ancora

con sempre crescente persuasione un sale insolubile o quasi nell'acqua, com'è il tannato di chinina sotto la forma squisita e perciò graditissima dei cioccolattini.

La nostra proposta venne ad incontrare antichi pregiudizi che si eran venuti formando contro l'assorbimento e l'uso terapeutico di questo sale di chinina.

Sebbene il Mariani (1) avesse dimostrato che i preparati chinacei più insolubili in acqua si assorbono così bene come quelli solubili, e a stomaco pieno meglio che a digiuno; sebbene il prof. Gaglio e i suoi allievi Modigliani e Flamini avessero dimostrato che il tannato di chinina si riassorbe completamente, non per lo stomaco ma per l'intestino; sebbene la prova clinica n'avesse riconfermato l'efficacia, anticamente riconosciuta a questo sale e da nessuno negata, tanto per prevenire quanto per curare le febbri di malaria; tuttavia la nostra proposta venne per due volte respinta dal Consiglio superiore di Sanità.

Fummo quindi condotti a ripetere nel 1906-07 nuove osservazioni sperimentali e cliniche.

Con le *ricerche sperimentali* il prof. Gaglio ha potuto dimostrare la mirabile *tolleranza dell'organismo verso il tannato.*

Ad es., i cani anche di piccola mole che con 1 gm. di idroclorato muoiono in poche ore, sopportano invece 10 gm. di tannato, e se pure presentano qualche disturbo (ambliopia, tremori), facilmente ne guariscono.

La ragione di questa tolleranza sta nel fatto che il tannato non si assorbe se non in rapporto alla decomposizione che subisce nel canale intestinale, per azione dei succhi digerenti.

E così il parziale e graduale assorbimento finisce per renderci ragione della tolleranza osservata per le alte dosi, nel mentre diviene di prezioso ausilio nella pratica specialmente infantile.

E infatti la poca velenosità del tannato di chinina, anche per dosi fortissime, ci lascia prevedere, che *colla diffusione di questo preparato per la cura della malaria nei bambini, fra gli altri vantaggi avremo anche quello di vedere sparire quei dolorosi casi di avvelenamento, che sono talvolta seguiti all'ingestione di quantità forti dei comuni sali solubili di chinina.*

Le esperienze del prof. Gaglio hanno pure dimostrato come *la quantità di chinina che nell'organismo dei cani si distrugge in seguito*

(1) Bollettino della Societa Lancisiana degli Ospedali di Roma. Anno XXIII, fasc. II, 1902. E questi Atti della Società per gli studi della malaria, vol. V, 1904.

alla somministrazione di tannato è maggiore di quella che si distrugge in seguito alla somministrazione dei sali solubili.

Non è improbabile che quest'altra buona proprietà del tannato concorra a spiegarne la tolleranza anche a dosi altissime.

Nè sono più discutibili gli *effetti profilattici e terapeutici di questo sale.*

E in verità il prof. A. Zeri somministrandolo nell'adulto, con 23 accurate osservazioni cliniche (15 casi di terzana grave, 7 di terzana lieve, 1 di quartana) dimostra che:

1° Nella cura della malaria acuta il tannato di chinina si mostra attivo quanto gli altri sali di chinina, purchè dato in dose sufficiente, tenendo conto cioè della percentuale di alcaloide contenuta in detto sale.

2° I pregi del tannato rispetto agli altri sali di chinina sono costituiti:

a) dall'essere meglio tollerato dal canale alimentare tanto più quando esistono disturbi degli organi digerenti (gastralgia, vomito e diarrea);

b) dall'essere meno tossico e quindi meglio tollerato da parte del sistema nervoso;

c) dall'essere poco amaro e quindi più accetto agli infermi, specie quando occorre a lungo somministrarlo.

Il che prova che il tannato può avere *qualche utile indicazione anche per combattere la infezione malarica nell'adulto.*

Ma il suo campo di azione è più specialmente nella pediatria.

E difatti le osservazioni proprie e di altri pediatri e medici malariologi il prof. Concetti ha raccolto in una memoria (1) da cui risulta che in complesso *negli anni 1905-1906 furono curati coi cioccolattini di tannato 736 bambini con soli 19 insuccessi* (2.5 %), *e furono profilassati 690 bambini con soli 8 insuccessi* (1.15 %).

In tutto furono 1426 bambini nei quali *a giudizio unanime* il tannato dimostrò assoluta tolleranza da parte del sistema nervoso, grande tolleranza gastrica, benefico effetto contro manifestazioni gastro-intestinali concomitanti.

Spiccata fu l'*azione contro la recidività.*

Difatti in 717 bambini, nei quali l'infezione fu vinta, solo in 56 (7.7 %) si ebbe la recidiva a scadenza più o meno lunga. Ciò che viene a confermare quanto il dott. Mazzitelli (2) aveva fin dall'anno scorso constatato a Santo Spirito.

---

(1) V. Atti, vol. VIII, 1907.
(2) V. Atti, vol. VII, 1906.

Anche l'*azione antiperiodica* fu marcata e spesso anche pronta.

Su 117 osservazioni nelle quali se ne prese nota in 25 l'azione fu immediata, in 29 si ebbe un solo accesso consecutivo, in 30 furono due soli gli accessi consecutivi, in 26 furono 3-4, in 32 il febbricitare durò ancora per 7-8 giorni, ma gli accessi susseguenti furono sempre meno gravi.

Il prof. Concetti conclude quindi ben a ragione che *la formola del tannato di chinina in cioccolattini è la più indicata di quante finora se ne siano poste in uso pei bambini* (1).

E in questo senso l'Accademia medica di Roma nella seduta del 3 marzo 1907 « udite le relazioni dei prof. A. Zeri e L. Concetti sulla efficacia del tannato di chinina nella cura e nella profilassi della malaria emise il voto perchè il R. Governo diffonda per la pratica infantile dei poveri questo preparato come fa per gli adulti cogli altri preparati ».

Contuttociò il Consiglio superiore di Sanità non volle decidersi ancora a riconoscere l'evidenza dei fatti; e così mentre i figli dei ricchi possono usufruire dei cioccolattini di tannato che l'industria privata mette largamente in vendita, i figli dei poveri non ne possono avere ancora per salvarsi dal flagello (che molto più li colpisce) della malaria.

Ultimamente (2) anche nell'Istituto delle malattie navali e tropicali di Amburgo si sono convinti dell'alto valore terapeutico e della preferenza da doversi dare ai preparati di chinina insolubili in acqua, per togliere il più grande ostacolo alla loro diffusione, qual'è il disgusto dell'amaritudine che hanno i sali solubili in acqua.

Il Giemsa riprendendo una proposta che venne già sperimentalmente fondata dal Mariani (3) fin dal 1902 consiglia addirittura la chinina basica cioè chinina anidra o triidrata.

Egli sostiene che se ne può mascherare la poca amarezza somministrandolo ai bambini nel latte freddo o tiepido.

Però nel cioccolatte non siamo affatto riusciti (4) a mascherarla; e quindi pur riconoscendo assai giusta la proposta Mariani-Giemsa per gli adulti, riteniamo che pei bambini non ci sia per ora di meglio del tannato, quando lo si prepari col metodo Regnauld (5), e abbia quindi una composizione

(1) Ultimamente il prof. Di Vestea e il dott. Collodi (Policlinico, 7 luglio 1907) hanno osservato che l'assorbimento della chinina è assai maggiore quando si somministra tal quale il cioccolattino di tannato, anzichè quando lo si somministra nell'ostia. Questa differenza è dagli AA. giustamente attribuita alla secrezione psichica dei succhi digerenti.

(2) Archiv für Schiffs- u. Tropen-hygiene, vol. XI, 1907.

(3) Loco citato.

(4) Martinotti e Castellini. V. Atti, vol. VI, 1905.

(5) Il Giemsa ha torto di mettere in seconda linea il tannato perchè di composizione incostante secondo i varii metodi di preparazione. Per to-

quasi costante intorno al 32 % di alcaloide. Anche economicamente parlando è ben meritata questa preferenza.

I nostri cioccolattini si potrebbero vendere al prezzo minimo di centesimi 6 il gm. di chinina riportata al solfato.

Venne altresì in evidenza un altro pregio del tannato di chinina, nei casi di idiosincrasia, anche emoglobinurica, verso gli altri sali più solubili in acqua.

A questo proposito ho raccolto *5 casi di infezione malarica complicata ad emoglobinuria, trattati e guariti coi cioccolattini di tannato di chinina.*

E ricordando che lo Stokwis (1) avvertiva già come nelle colonie olandesi all'uso del tannato non era mai seguita l'emoglobinuria, ho pregato e prego i colleghi di regioni malariche perchè provino il tannato (possibilmente in forma di cioccolattini) tanto nei casi di intolleranza gastrica o nervosa e di qualsiasi genere di idiosincrasia pei sali chinacei solubili in acqua, quanto nei casi di emoglobinuria consecutiva nei malarici all'uso dei sali più solubili di chinina.

La raccolta di molte osservazioni scrupolose potrà decidere se in questi casi il tannato possa liberare il medico da una grande responsabilità e l'infermo da un pericolo imminente.

***

A perfezionare e completare il servizio del chinino di Stato bisognerebbe *abbassare ancora, almeno pei comuni e per le opere pie, il prezzo del bisolfato, idroclorato e bicloridrato in forma di confetti.*

Si raggiungerà quest'alto fine, senza scemare gli utili netti dell'azienda (v. tab. 12) appena i revisori della nostra farmacopea si persuaderanno di non esigere un'eccessiva purezza, al di là di quella che le farmacopee straniere domandano. Senza dubbio gli alcaloidi secondari, che nella corteccia di china sono allato della chinina, o con questa dividono l'azione antiperiodica o per lo meno certamente non la disturbano (2). Quindi la purezza chimica, essendo costosa a raggiungere, aumenta il prezzo senza accrescerne in proporzione il valore terapeutico, e quindi clinicamente parlando senza alcuna ragione.

---

gliere questo inconveniente basta scegliere questo o altro dei metodi migliori. Ultimamente poi il MARTINOTTI, perfezionando il metodo Regnauld, è arrivato, per una via facile ed economica, a preparare un tannato basico del tutto insolubile in acqua, di composizione costante, col 39.35 % di chinina anidra, e come tale preparabile sempre quando si voglia.

(1) Leçons de Pharmacothérapie, tom. 3.

(2) V. anche F. MARIANI. Atti, vol. V, 1904, e Policlinico (sezione pratica), Roma, 1904.

***

E infine venne sempre meglio perfezionata la preparazione delle *fiale sterilizzate di idroclorato di chinina con etiluretano* secondo la felice formola del prof. Gaglio. Non ci stancheremo quindi ricordare ai medici che essa merita davvero la preferenza su l'altra (ancora purtroppo così in uso) del bicloridrato, troppo irritante per la sua acidità, oltrechè difficile a riassorbirsi.

Specialmente ai colleghi del Mezzogiorno e delle Isole, come pure ai colleghi di Grecia ci permettiamo dare il consiglio di non abusare delle iniezioni sottocutanee, e, quando occorrono, preferire la detta formola.

B. — Cura radicale delle febbri recidive

I fratelli Sergent hanno confermato che *i grossi schizonti endoglobulari e i gameti semilunari non vengono modificati nemmeno dalle continuate iniezioni sottocutanee di chinina.*

Anche per ciò conviene dunque preferire la via orale e i *preparati meglio tollerabili dallo stomaco e digeribili dell'intestino.*

Un grande avvenire per la cura radicale delle recidive spetta secondo me ai *preparati più insolubili in acqua,* come tannato di chinina, e come la stessa chinina basica, somministrandoli sempre nella forma più aggradevole.

Sono pure convinto che si dovranno ridurre sempre più le iniezioni sottocutanee ai soli casi nei quali *periculum est in mora* e sull'assorbimento gastro-intestinale non si può più contare.

Per ottenere i migliori successi nella cura radicale della recidività si dimostrò ancora una volta più efficace il nostro metodo quotidiano, continuato per mesi.

Con questo si riducono più specialmente le recidive a breve scadenza. Più difficile è ridurre quelle a lunga scadenza.

P. es. in Sardegna la recidività a breve scadenza si ridusse al 3.3 % e al 18 si mantenne quella a lunga scadenza.

Generalmente però l'accesso diviene più mite, talora anzi così mite che può sfuggire all'osservazione medica, e per fino può permettere un moderato lavoro.

E' assai confortante che secondo l'osservazione sempre accurata del Polettini *la percentuale delle guarigioni stabili, radicali, dell'infezione nei bambini curati subito e assiduamente è più alta che negli adulti.*

Il che dà a credere e sperare che *quando avremo per essi a piena disposizione preparati aggradevoli* come ad es. i cioccolattini di tannato, *potremo essiccare più agevolmente parecchi serbatoi di infezione* che oggi sono ancora di pericoloso contagio a tutta la collettività.

Quanto alla *recidività nei suoi rapporti con le forme parassitarie* il dott. Carducci osserva che la febbre estivo-autunnale trattata anche con dosi generose di chinino non si tronca subito, ma dà luogo all'accesso del giorno seguente; trattata nella pseudocrisi e nell'elevazione precritica si riproduce l'accesso seguente, ma l'elevazione precritica manca od è lieve; trattata nella crisi si riproduce tuttavia l'accesso seguente ma con una elevazione precritica attenuata.

A sua volta il dott. Polettini dimostra che con l'assidua cura quotidiana da me proposta guarirono il 77 % delle terzane gravi, 51 % delle quartane e solo 44 % delle terzane lievi.

Queste ultime sono dunque più facili a guarire accesso per accesso ma più difficili a sradicarsi mediante la chinina. Il che viene a confermare (v. pag. 852) come e perchè siano pure le ultime ad abbandonare una zona malarica.

Tutto ciò poi dimostra come *la natura tende sempre ad assicurare la specie parassitaria anche contro un rimedio così specifico e potente quale è la chinina!*

Ancora una volta si è poi confermato che *in alcuni organismi (ovvero anche per certe varietà parassitarie?) è impossibile sradicar a nostro volere l'infezione, cioè impedire la recidività, specie a lunga scadenza, neanche colle più intense e prolungate cure chininiche, e miste.*

A Pontepossero, per esempio, si notano ancora alcuni che dagli anni 1901, 1902, 1903 recidivano con estivo-autunnale, o con terzana lieve, o con quartana.

Essi prima del 1904 furono sottoposti a cure intense e prolungate di certe pillole chinino-ferro-arsenicali decantate come infallibili. E ciò *fia suggel che ogni uomo sganni dal credere o far credere che l'aggiunta di arsenico e ferro possa accrescere la potenza curatrice del chinino.*

Ognuno, del resto, che ebbe od ha in cura dei malarici può assicurare che certe recidive ugualmente e ostinatamente resistono alle migliori cure di ferro, arsenico e chinino, separatamente o insieme somministrati per la via orale e anche sottocutanea.

Ma per chi non credesse ancora alle osservazioni nostre e dei nostri soci, riportiamo l'autorevole e spassionata esperienza dei fratelli

Sergent, che per conto dell'Istituto Pasteur sono già alla 5ª campagna antimalarica in Algeria.

La quinisation par un européen représente le meilleur procédé pour emender un reservoir de virus. Mais elle coute fort cher (1) et dovra être reservée aux localités très paludeennes.

Nous avons employé uniquement *des dragées de bichlorhydrate de quinine de 0.20 centigrammes du genre des dragées de l'Etat italien.* Ces dragées ont été admirablement acceptée.

Après cette mise à l'essai datant de deux ans *l'unanimité a été tellement complète en faveur des dragées*, que nous avons demandé a M. le Gouverneur général de faire acheter en dragées de biclorhydrate les 9/10 de la quinine que l'Etat fournit aux communes de l'Algérie.

....

On assiste à des véritables transformations à la suite d'ingestion de quelques dragées quotidiennes.

....

Chez les traités par la cure quotidienne (439 subjets examinés avant et après la campagne sur environ 2000 personnes quininisées) le nombre des rates améliorées (27.3 % diminuées, 11.5 % guéries) est bien supérieur à celui des rates augmentées (8.2 %). L'inverse a lieu chez les témoins.

E ormai di quanti altri fuori d'Italia sono a lottare contro la malaria, non vi ha alcuno che conti su di altri rimedi all'infuori del chinino.

Ad ogni modo speriamo che quanti credono non potersi dell'arsenico fare a meno per sradicar la malaria, eseguano sempre, come insegna il buon metodo sperimentale, osservazioni comparative (2) col solo chinino, che attaccando la causa può bastare a sradicarne più direttamente gli effetti,

Di certo poi è inutile per lo scopo profilattico, e per lo stomaco, nella calda stagione delle febbri, non è rimedio indifferente l'arsenico.

L'infezione febbrile non ha nemmeno bisogno d'arsenico per guarire.

L'infezione latente molte volte si sradica col solo chinino, ogni giorno e per lungo tempo somministrato nella più aggradevole forma.

---

(1) Da noi invece col chinino di Stato a mitissimo prezzo la difficoltà economica venne già eliminata. E la chinizzazione è fra tutte la più economica profilassi. Per esempio in Sardegna il Cassgrandi calcola che per circa 5000 profilassati di fronte a una spesa di lire 4550 pel chinino consumato corrisponde un vantaggio economico di circa lire 15,000 soltanto per le giornate di lavoro risparmiate.

(2) E' da avvertire che gli stessi più autorevoli fautori delle pillole chinino-ferro-arsenicali si sono ben guardati dal fare mai esperienze di controllo col solo chinino

Spesso purtroppo non è in poter nostro sradicarla oltrechè col chinino, di cui non si può mai fare a meno, eziandio col cambiar clima e migliorare alimentazione, abitazione, vestiario e lavoro.

Con troppa leggerezza intanto si lascia diffondere nel popolo l'arsenico, del quale sono ben noti gli effetti cumulativi e venefici. Chi può darci la garanzia che sotto il suo uso ed abuso non si stabiliscano degenerazioni grasse delle ghiandole gastriche e del fegato, che imprimano perpetuamente un marchio di debolezza costituzionale negli individui? Tanto più sentiamo quindi il dovere di levare la voce ora che si lascia allegramente popolarizzare l'arsenico dolcificandolo con la saccarina pei bambini, e pure alcoolizzandolo per gli adulti.

Del resto l'arsenico dovrebbe sempre essere somministrato sotto la sorveglianza del medico.

E perciò caso per caso tocca al medico di scegliere i preparati ferro-arsenicali (se ne trovan tanti, a così tenue prezzo), e somministrarli separatamente e in ore diverse del chinino: sarà tanto meglio per lo stomaco e per l'assorbimento dello stesso chinino che le combinazioni coll'arsenico possono rendere più difficile.

Forse, anzi, le migliori di tutte le miscele sono quelle che meno tolgono efficacia, neutralizzandolo in composti indigeribili, al primo e vero rimedio della infezione malarica: il chinino!

E in questo senso forse talora la vecchia mistura del Baccelli può esser preferibile alle miscele pillolari.

C. — Cura preepidemica della malaria recidivante o latente.

Tutti ormai i nostri soci sono d'accordo nel ritenere incomoda, inefficace e troppo costosa la cura intensiva preepidemica suggerita dal Koch.

Tutt'al più si potrà cominciar la profilassi un po' più presto (15 giugno) e negli individui già malarici si potrà iniziarla per una settimana o due a dosi terapeutiche di 5-6 confetti al giorno e possibilmente col preparato più ricco dell'alcaloide specifico.

D. — Profilassi medicamentosa o chininica.

Ormai possiamo dire: solo chi non l'ha provata o non è mosso da ragioni estrinseche può dubitare dell'efficacia della profilassi chininica a dosi quotidiane medie (40 cgr. negli adulti, la metà nei

bambini) e nelle aggradevoli forme dei confetti o cioccolattini di chinina.

Per facilità di applicazione e prontezza dei risultati questa profilassi riscosse unanime fiducia anche nel 1906 da tutti i nostri soci.

E possiamo esser lieti che ogni giorno più vinca gli antichi pregiudizi contro il chinino ed entri sempre più nei costumi del popolo che vive e lavora in luoghi di malaria.

Soltanto i nostri soci che ne tennero più esatto conto, secondo ci dice la seguente

Tabell

Profilassi medicamentosa col chinin

Luogo dove fu applicata la profilassi	Preparato usato	Dose giornaliera — Cgr.	Durata del trattamento — Mesi	Persone profilassate	Si ammalarono di recidive	
					Numero	%
Vercellese (Stroppiana)	Bisolfato in confetti	20	4	300	..	..
Lomellina (Candia)...	Id.	»	2	500	..	..
Milano.	Id.	»	4	2,705	..	..
Veronese (Vigasio, Ponteposero)	Id.	»	4	1,558	..	..
Agro Romano. . . .	Id.	40	1-5	42,726	2 785	6.5
Id. Tiburtino . . .	Id.	»	»	1,230	..	..
Id. Pontino. . . .	Id.	»	»	11,495	1.265	11.0
Mezzogiorno continentale (escluse le Calabrie)	Id.	»	»	29,256	..	..
Calabrie.	Id.	»	»	1,098	..	..
Sicilia.	Id.	»	»	14,399	..	..
Sardegna	Id.	»	»	5,105	171	3.3
Varie parti d'Italia. .	Tannato in cioccolatini	16-32	»	432	..	..
			Totale nel 1906 . . .	110.804	..	..
			Id. nel 1905 . . .	59,340	..	..
			Id. nel 1904 . . .	52,690	..	..
			Id. nel 1903 . . .	19.021	..	..
			Id. nel 1902 . . .	3,055	..	..

ci dànno un totale di 110,804 (1) individui che nel 1906 fecero uso del chinino di Stato a scopo profilattico e ammalarono soltanto 7115, cioè il 6.2 %.

---

(1) Questa cifra complessiva non comprende le truppe di terra e di mare e 45.628 ferrovieri che pure fecero soltanto questa profilassi chininica.

V.

ti Stato in tutta Italia.

Si ammalarono di primitive		Si ammalarono in totalità		Controllo	Osservatori	Osservazioni
Numero	%	Numero	%	%		
..	..	1	0.33	0.6	Dott. N. Vaccino.	
..	..	4	0.80	10.0	Dott. Omodei-Zorini	
..	..	98	3.6	..	Prof. Bordoni e dottor Bettinetti.	
..	..	3	0.19	11.2	Dott. Polettini e Cipriani.	
435	1.01	3.220	0.75	47.0	Medici del Comune, della Croce Rossa, della Società contro la malaria.	
..	..	46	3.7	..	Dott. Pozzilli.	
29	0.25	1,294	10.6	..	Medici della Croce Rossa.	
..	..	882	3.0	9,8-25,3 50,0		
..	..	41	3.7	..		
..	..	1,207	8.3	..	Medici della Croce Rossa e di pochi comuni	
140	2.7	311	6.1	..	Medici della Società cagliaritana contro la malaria	In qualche luogo fu usato il metodo discontinuo.
..	..	8	1.8	..		
..	..	7,115	6.4	..		
..	..	3,458	5.8	..		
..	..	4,262	8.0	..		
..	..	932	5.6	..		
..	..	235	7.7	..		

A sua volta la seguente tab. 5, meglio che la precedente, ci dimostra il valore di questa profilassi vuoi per mantener sani gli indenni o i guariti, vuoi per infrenare l'infezione latente nella stagione in cui può esser fonte di contagio per gli altri.

TABELLA V.

Profilassi chininica nei sani e nei malarici.

Località	Totale profilassati	Indenni o guariti			Malarici in atto			Ammalarono di febbri	
		Totale	Ammalarono	%	Totale	Recidivarono	%	Totale	%
Agro Romano (Croce Rossa)	16,820	11,724	129	1.1	5,096	447	8.7	576	3.4
Agro Pontino (Croce Rossa)	11,495	992	29	2.9	10,503	1,265	12.0	1,294	10.6
Sardegna	5,105	1,689	140	5.0	3,416	171	8.2	311	6.0
Totale . . .	33,420	14,405	298	2.1	19,015	1,883	9.9	2,181	6.5

Dove si dimostra che *quando all'inizio della campagna si fece con la massima possibile approssimazione un regolare censimento dei presunti indenni o guariti separatamente dai presunti infetti, i primi ammalarono appena nella proporzione del 2.1 %, i secondi in quella del circa 10 %.*

***

Ora che il nostro metodo è entrato nella pratica in Italia e fuori, sarà bene riassumere brevemente la *storia della profilassi chininica.*

L'efficacia della chinina quale mezzo profilattico fu riconosciuta fin dalla metà del secolo passato, e d'allora in poi venne sempre più confortata da nuove prove (1). *Non era però mai riuscita ad entrare nella grande pratica.*

Ciò deve essere dipeso più che altro dalla forma e dose di somministrazione adoperata.

Quanto alla *forma* tutti i vini, rosoli e liquori chinati, specialmente presi a digiuno, irritavano troppo lo stomaco, non riuscivano a mascherare la amarezza che pei più è assai disgustosa, oltrechè davano troppo poco di chinino. Vennero quindi abbandonati anche dalle truppe fra le quali erano più in uso (2).

E appunto per eliminare ogni disgusto non c'è che dare alla chinina la forma più aggradevole possibile, e perciò quella di confetti e di cioccolattini, che proponemmo e proponiamo con sempre più convinta insistenza.

Quanto alla *dose* s'erano preconizzate:

a) piccole dosi quotidiane (cgr. 10-20 nell'adulto);

b) dosi medie (cgr. 30-50) ogni 2-3 giorni;

c) dosi alte (cgr. 0.60-gr. 1) ogni 4-7 giorni.

Senza disconoscere che ognuno di questi metodi abbia avuto dei successi, possiamo però affermare che il nostro metodo delle dosi medie quotidiane e nelle forme più aggradevoli può arrecare il massimo dei vantaggi col minimo degli incommodi.

E ormai gli stessi medici residenti in zone malariche (Agro Romano, Pontino...) sono essi i primi a far la profilassi chininica quotidiana provandone i vantaggi e dando il buon esempio: e individui che in ogni età dalle primissime alle ultime fecero ormai da 7 anni regolarmente ogni estate ed autunno la cura chininica preventiva, non ne hanno sofferto menomamente, e ogni volta al ricominciar della sta-

---

(1) Confronta: A. LAVERAN, *Prophylaxie du paludisme.* Paris, Masson et C.

Quest'insigne malariologo anche recentemente (Bull. de l'Acad. de méd., séance du 27 juillet 1906) ripeteva: *l'emploi préventif de la quinine est d'une utilité incontestable dans la profilaxie du paludisme.*

(2) Anche il LAVERAN (l. c.) giustamente ammonisce che *le médecin doit d'ailleurs éviter de prescrire des médicaments sous formes de boissons alcooliques pour des raisons faciles à comprendre.*

gione delle febbri la reclamano con insistenza e la praticano con regolarità.

I nostri soci con sempre crescente e ormai unanime convinzione sostengono che:

1° La chinina è un rimedio tonico, e dopo i 3-4 giorni non dà alcun disturbo se anche per mesi vien preso ogni giorno.

Per qualche individuo che non tolleri i sali più solubili si presta, per fortuna, assai bene il tannato di chinina;

2° Coloro che fanno la cura preventiva quotidiana, se sono indenni, ammalano ben raramente, se furono malarici recidivano molto meno, e in ogni caso l'accesso è d'ordinario più leggiero e più facile a curarsi con le ulteriori dosi terapeutiche;

3° Nelle zone e negli anni di malaria gravissima è bene usare i preparati più ricchi di chinina (idroclorato, bicloridrato); nelle zone e negli anni di malaria grave può bastare il bisolfato; nell'un caso e nell'altro la dose può sempre essere di 40 cgr. al giorno (la metà pei bambini), ma la profilassi dev'essere estesa a tutta la popolazione più esposta a contrarre le febbri;

4° Può essere utile elevare temporaneamente la dose a 60 cgr. al giorno quando coincidono cause occasionali (strapazzi, raffreddamenti, indigestioni) che possano determinare o facilitare lo scoppio dell'infezione primitiva o della recidiva;

5° Nelle zone di malaria lieve possono bastare 20 cgr. al giorno, ovvero può la profilassi venire circoscritta a sole quelle abitazioni o località dove ci siano degli infetti;

6° Nei luoghi ed anni di malaria mitissima possiamo limitarci alla profilassi delle recidive, caso per caso di febbre che si sviluppi.

Queste norme che risultano da un'esperienza sessennale, ed ormai estesa a tutte le provincie d'Italia e a regioni malariche estere, dovrebbero essere sancite in apposite istruzioni per gli ufficiali sanitari e i medici pratici.

Poichè se la cura dell'infezione malarica deve essere sempre in ogni caso lasciata al criterio del medico, la profilassi invece deve essere, come per le altre epidemie, regolata da norme più precise possibili.

Ad ogni modo i nostri soci hanno ormai indicato come *con la profilassi chininica si può arrivare a combattere prontamente la malaria*, senza perder tempo a radunar commissioni per studiare ciò che è noto da un pezzo sul valore curativo e preventivo del chinino, senza far raccomandazioni invece che mostrare dei fatti, senza diramar circolari e moduli tanto più inefficaci per quanto più complicati e contrari

alle buone norme della pratica e della vigente nostra organizzazione antimalarica (1).

E. — Profilassi meccanica.

E' sempre indiscutibilmente efficace.

Per esempio durante il 1906 nelle miniere sarde di 500 così profilassati ammalarono 16 ossia 3.20 %. A Pontepossero su 514 appena 0.77 %.

Ma è pur sempre molto difficile farla osservare puntualmente per le case (2) da chi non ha educazione igienica, e farla adottare per la protezione personale da chi deve di notte lavorare all'aperto. Quindi è che, così lungo le ferrovie di Stato e private, come per le guardie di finanza e pei contadini questa profilassi si va sempre più associando con la profilassi chininica.

Per le ferrovie venne limitata alle zone di malaria più grave, e, fra queste, si estenderà man mano alle antiche reti mediterranee e sicule.

F. — Profilassi mista (chimico-meccanica).

Per comprenderne il valore giova dare uno sguardo alla tabella 6 dove sono esposti i risultati ottenuti lungo la *antica rete delle ferrovie adriatiche* prima e dopo il loro passaggio allo Stato. Dal 69.92 prima della profilassi la percentuale dei casi discese a 19.84 nel 1906, e la perdita delle giornate di malattia per ogni agente e per anno dal 5.48 discese a 1.69, ad onta sia cresciuta la durata della cura.

---

(1) In alcuni moduli diffusi da una Commissione governativa si consiglia ancora di prender chinino a stomaco digiuno, e di preferire preparati disciolti (quali?) e diversi (quali?) da quelli dello Stato.

Questi per fortuna hanno acquistato in mezzo ai medici e in mezzo al popolo un tal credito che nessuna malevolenza o diffidenza può ormai più togliere.

(2) Anche nelle case meglio protette le zanzare s'insinuano addosso all'uomo e alle sue cose. Occorre quindi sempre vigilare.

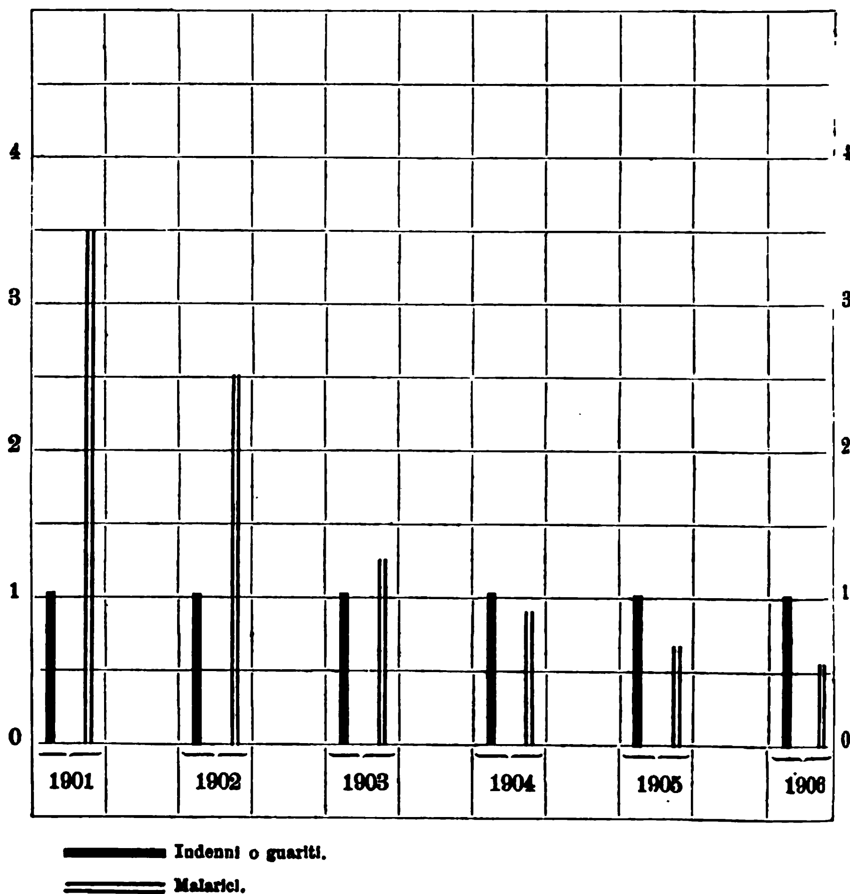
TABELLA VI.

La malaria lungo le linee della ex-Rete Adriatica.

	1888-1901	1902	1903	1904	1905	1906
Percentuale dei casi . .	69.92	44.93	30.32	33.10	39.44 (a)	19.84
Giorni di durata media dei casi	7.88	6.99	6.25	7.53	7.64	8.52
Giornate di malattia perdute per ogni anno da ogni agente	5.48	3.12	1.89	2.48	3.01	1.69

(a) Anno di recrudescenza periodica dell'epidemia.

Rapporto fra individui indenni o guariti ed individui malarici sulle linee protette nel sessennio 1901-1906.



A sua volta la figura 4 dimostra come si è capovolta dal 1901 in poi la proporzione fra gli indenni o guariti e i malarici.

Nelle ferrovie dello Stato poi durante il 1906 la percentuale delle febbri fu del 24.65 % agenti, del 14.96 % familiari, e in totale del 17.67 %.

Risultati anche più brillanti possono vantare le *ferrovie Sarde* (tabella 7), ove la percentuale dei colpiti dalle febbri è discesa dal 46-40 fino al 6.4, e dal 59-46 fino al 3.7 %. In quest'ultimo caso alla profilassi mista si è aggiunta eziandio la bonifica idraulica delle cave di prestito e di altre contigue zone acquitrinose.

TABELLA VII.

La malaria lungo le ferrovie Sarde.

	Percentuale di colpiti dalle febbri negli anni									
	1897	1898	1899	1900	1901	1902	1903	1904	1905	1906
Ferrovie Reali Sarde	40	46	40	21	17	15	10	15	16	6.4
Ferrovie Secondarie Sarde .	..	..	..	..	..	59	58	57	46	3.7

Lungo la *ferrovia sicula occidentale* basta la figura 5 a dimostrarci i benefizi sanitari ed economici della profilassi meccanica, qui pure integrata con quella chininica.

Fra le *guardie di finanza* (tab. 8) con la sola profilassi meccanica dal 65.30 % si era discesi a circa il 12; e coll'aggiunta della profilassi chininica si è discesi ancora fino al 7.31.

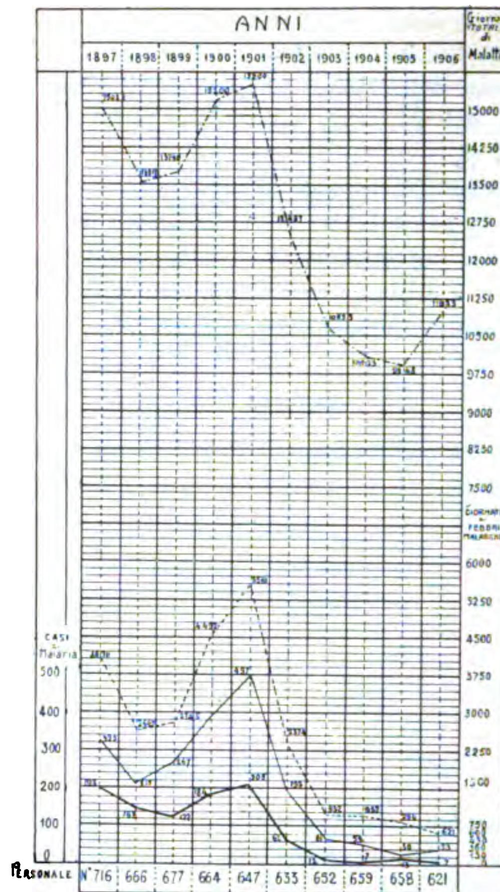


Fig. 5.

TABELLA VIII.

La malaria nelle Guardie di Finanza.

Anno	Numero delle Guardie di Finanza	Casi di febbri verificatisi	Percentuale	*Osservazioni*
1900–02 .	1738	1035	65.30	Nessuna profilassi.
1903. . .	1751	222	12.73	Profilassi meccanica.
1904. . .	1714	209	12.19	Id. id.
1905. . .	1721	187	10.86	Id. id. e comincia la profilassi chininica.
1906. . .	1614	118	7.31	Profilassi meccanica e chininica.

Così nelle *miniere di Arbus* avvenne che mentre dei profilassati col solo chinino ammalarono il 7 %, di quelli sottoposti alla profilassi mista solo il 3 %.

Finalmente per le *aziende rurali*, quanto giovi la profilassi mista è dimostrato dalla seguente

TABELLA IX.

Malaria a Pontepossero e Uniti (Podere Ponti).

Anni	Popolazione colpita da febbri
Prima del 1902	60.80 %
nel 1902	50 »
» 1903	40 »
» 1904	30 »
» 1905	16 »
» 1906	2.8 »

Cioè di anno in anno il tipo della malaria è cambiato dalla forma grave a quella lieve, e dalla lieve alla lievissima.

. . .

G. — Distruzione delle zanzare.

Da più parti viene confermato che i pesci distruggono le larve di zanzare e contribuiscono a tenerne libere le acque marine, quando anche vi si possano eccezionalmente annidare.

Il dott. De Vogel ha constatato che l'infuso di *Derris elliptica* non è efficace a distruggere le larve mentre uccide i pesci che le divorano.

Si è confermato che pure le anofeline tropicali (Wellmann), come le nostre, rifuggono dal depositare le uova in acque esalanti odore di H^2S o di NH^3.

Quanto alle *misure antilarvali* i fratelli Sergent confermano come le grandi petrolizzazioni sono talora del tutto inefficaci se non vengono ad essere completate dai diserbamenti dei canali stagnanti e dai lavori di bonifica idraulica.

E certe volte la petrolizzazione deve essere ripetuta ogni otto giorni; perciò da noi, ove il petrolio è sempre a troppo alto prezzo, l'impossibilità di adottarla.

E si aggiunga che per tante parti dal Nord al Sud d' Italia, anche dopo compiute le più perfette bonifiche idrauliche, le anofele vi permangono adattandosi a vivere la lor vita acquatile in abbeveratoi, pozzi, vasche, e in qualsiasi ristagno d'acqua, dove spesso non è facile aggredirle.

Quindi sono ingenti le difficoltà di fare scomparire le anofele da un esteso territorio dove sono impiantate da secoli.

Per fortuna però con la ben diretta profilassi dell'uomo sano e con la continuata bonifica dell'uomo malarico si può in breve tempo risanare una regione intensamente infestata dalla malaria anche se l'anofelismo vi persista, e attorno attorno con l'anofelismo persiste anche l'epidemia.

Molto insegnano in questo senso: le ferrovie di Stato e private che percorrono le zone più basse e palustri d'Italia; Vigasio e Ponteposssero nell'Agro Veronese; l'Agro Romano in mezzo ai Comuni contermini; nonchè la seguente

TABELLA X.

Malaria nel comune di Argenta (1906).

Frazioni del comune	Popolazione colpita da febbri
Longastrino	50.25 %
Filo	13.76 »
San Biagio	11.24 »
Argenta, Bando, Boccaleone	6.96 »
Consandalo	2.71 »
Ospitale, Traghetto	1.59 »
San Nicolò, Codifiume	0.14 »

Il dott. Orta chiaramente dimostra che, mentre manca ogni altra differenza, sono invece in ragione inversa della morbosità il consumo e in ispecie l'uso preventivo del chinino; cioè al massimo di morbosità corrisponde il minimo consumo di chinino e viceversa.

H. — Bonifiche idrauliche.

Fu proseguito per merito del prof. Rossi e del dott. G. Guarnieri lo studio degli effetti igienici delle bonifiche idrauliche dal piano di Reggio Emilia al littorale ionico nelle provincie di Salerno e delle Calabrie.

E si è confermato che la bonifica idraulica anche meglio compiuta non è mai sinonimo di distruzione delle anofeline; e tuttavia può condurre così nell'Emilia, come nel Mezzogiorno (Velia e Policastro) al risanamento igienico, quando sia però accompagnata o seguita dalla coltura agraria.

Dapertutto poi si lamenta il fatale diboschimento che compromette le vecchie e migliori bonifiche idrauliche e rende assai difficili, talora impossibili (Valle del Crati) le bonifiche in pianura.

K. — Bonifiche agrarie — Colonizzazione.

Esempi tipici di redenzione dalla malaria e di colonizzazione di estesi territori con bonifiche idrauliche ancora incomplete e con superstite anofelismo, s'incontrano oltrechè nell'Agro romano, anche nel Mezzogiorno.

Quivi merita di essere segnalata ad esempio la tenuta della Pantana nella valle dell'Alento, in quest'ultimi anni risanata e colonizzata dall'ingegnere E. Talamo.

Così pure l'attenuazione della malaria ha proseguito nell'Italia risicola. Citiamo il seguente esempio del comune più risicolo del Vercellese.

TABELLA XI.

Malaria nel comune di Stroppiana.

Anno	Casi di malaria	Chinino consumato
1903	87	grm. 800
1904	57	» 2,500
1905	44	» 4,025
1906	26	» 5,832

Ed è così che oggi la profilassi specialmente chininica, detta anche la profilassi agricola poichè la più pratica per i contadini, rende possibile la colonizzazione di terre (1) finora disabitate per colpa della malaria.

J. — Legislazione sanitaria speciale contro la malaria.

Ai 28 febbraio di quest'anno è uscito il Regolamento per l'applicazione della legge 19 maggio 1904, la quale ai lavoratori concede chinino gratuito anche a scopo preventivo.

Col nuovo regolamento però non è ancora ben disciplinata la distribuzione regolare del chinino. E' trascurata, p. es., la cointeressenza dei proprietari e industriali che, se offrissero semplici distributori di fiducia loro

(1) V. prof. TITO POGGI. Relazione alla Società agricola industriale italiana. Roma, 1907. Questa Società ha iniziato con la profilassi chininica la colonizzazione nel Grossetano, e sopra un personale di 143 stabili e 1228 avventizi ebbe in tutta la stagione del 1906 cinque febbri recidive e una primitiva.

e del medico, spenderebbero meno pel chinino e lo renderebbero molto più efficace nello stesso loro tornaconto.

Le troppe noie e formalità che a tutti si richiedono (1) per le denunzie tolgono ad esse ogni valore di verità, e rendono completamente illusoria ogni statistica della morbosità della popolazione.

Troppe noie e formalità si richiedono altresì per le ordinazioni del chinino di Stato (2).

Vicino a tanti nuovi doveri che si pretendono, nessun compenso nè materiale nè morale è dato ai medici, anzi a loro si negano dal fondo degli utili dell'azienda del chinino (v. tab. 12) quei premi che si dànno invece ai comuni così spesso indifferenti ed ostili.

Se si pensa al danno professionale che deriva dalla diminuita infezione e al sopralavoro per combatterla, bisogna dire che la enorme maggioranza dei nostri medici (3) è davvero esemplare per abnegazione, altruismo e devozione al bene dell'umanità.

Avemmo or ora, il 16 giugno p. p., la tanto invocata legge sulle risaie, e possiamo esser lieti che sancisca tutti i migliori principi delle nostre leggi antimalariche. Le quali dobbiamo esser lieti che anche la Grecia abbia ultimamente ed integralmente adottate.

L. — Organizzazione della campagna antimalarica.

I nostri metodi di propaganda sono anche fuori d'Italia favorevolmente giudicati.

P. es. quei *campi dimostrativi della profilassi chininica*, sui quali si vollero gittar diffidenze e calunnie, sono riconosciuti dai fratelli Sergent fra i migliori mezzi di propaganda efficace.

Le lezioni delle cose o dei fatti valgono sempre più che tutte le prediche delle parole e più anche di tutte le circolari burocratiche.

Per quel che può valere fra i nostri contadini, così spesso analfabeti, una propaganda popolare antimalarica venne sempre più attivata eziandio col diffondere opuscoli e fogli volanti, per mezzo dei maestri, dei salariati dello Stato e delle provincie, nonchè dei ferrovieri e dei carabinieri.

---

(1) Si dovrebbero tutt' al più limitare a quei pochi medici istruiti nello studio della malaria.

(2) V. anche A. De Maio. Servizio amministrativo nella lotta contro la malaria. Casalbordino, 1907.

(3) Al V Congresso di Venezia il 4 giugno p. p. fu approvato per acclamazione il seguente ordine del giorno:

« Il V Congresso della Associazione nazionale dei medici condotti, che sta all'avanguardia di tutti i più grandi problemi igienico-sociali, stabilisca un piano di organizzazione fra tutti i medici condotti delle regioni malariche d'Italia, per una lotta efficace e permanente contro la malaria, che costituisce uno degli ostacoli principali contro il miglioramento sanitario ed economico di gran parte del paese ».

Anche la Bulgaria sta preparandosi a lottare contro la malaria, e verso tale scopo frattanto una lega antimalarica sul tipo della nostra stimola e coadiuva i pubblici poteri.

Dobbiamo essere molto grati anche al prof. Savas che, venuto fra noi, e persuaso sul posto, volle prendere a modello la lotta ingaggiata alacremente contro questo flagello.

Ciò non toglie che noi non dobbiamo sempre più perfezionare la nostra organizzazione secondo l'esperienza ci consiglia.

Domandiamo quindi ancora:

1. Ispettori o commissari o delegati antimalarici *alla dipendenza* (1) dei medici provinciali, in ognuno almeno dei circondari o distretti più malarici.

2. Condotte rurali, consorziali o comunali destinate ad integrare la assistenza sanitaria così deficiente nelle campagne dei comuni più malarici.

3. Premi direttamente ai medici più valorosi.

Dagli utili del chinino di Stato (v. tab. 12), e dagli utili delle somme accantonate per le bonifiche idrauliche presso la Cassa depositi e prestiti, nonchè dal bilancio del Ministero dell'Interno sarebbe assai facile mettere insieme un milione almeno all'anno per pagare questa organizzazione integrale.

Alle *Cattedre ambulanti di agricoltura* molto dobbiamo e più dovremo per quanto man mano più crescerà la convinzione il risorgimento dell'agricoltura dalle Maremme a tutto il Mezzogiorno e alle Isole parte dalla certezza che l'uomo può vivere oggi sopra la terra che ieri doveva fuggire come inospitale.

Molto pratica è l'iniziativa ripresa in Sardegna dal Casagrandi per istruire i medici chiamandoli a brevi *corsi di perfezionamento negli studi della malaria*, e avviandoli così a fare opera cosciente e feconda. Arricchiti delle nuove cognizioni, spogliati di certi pregiudizi attinti alle scuole sull'azione del chinino, e convinti essi per primi del suo enorme valore, specialmente profilattico, riescono poi a convincere meglio il popolo e i proprietari, e gli industriali e gli amministratori sulla possibilità, necessità, utilità di applicare le nostre leggi.

(1) Insistiamo sempre sulla necessità di non oltrepassare nè screditare l'attuale gerarchia sanitaria provinciale sovrapponendole estranei, siano pure di grande autorità clinica.

M. — Risultati ottenuti.

Giova anzitutto mettere a confronto il consumo del chinino di Stato con la mortalità per malaria colla seguente

TABELLA XII.

Chinino di Stato e mortalità per malaria in Italia.

Consumo di chinino di Stato		Mortalità per malaria		Utili netti dell' azienda del chinino di Stato — Lire
Anno finanziario	Chilogram.mi venduti	Anno	Totale morti	
...	...	1900	15,865	...
...	...	1901	13,358	...
1902-1903 . . .	2.242	1902	9,908	34,000
1903-1904 . . .	7,234	1903	8,513	183,038
1904-1905 . . .	14,071	1904	8,501	183,382
1905-1906 . . .	18,712	1905	7,838	293,295
1906-1907 . . .	20,723	1906	4,886	350,000

La mortalità per malaria in tutta Italia è dunque scesa di $^{2}/_{3}$ dal 1900 in poi.

Per meglio valutare questo grande avvenimento è bene dare ancora uno sguardo alle figg. 1 e 2, che mettono in confronto la mortalità generale e la mortalità regionale per malaria con il consumo del chinino dell'industria privata e con l'introduzione ed il consumo del chinino di Stato.

Questo entrò nel 1902, e quindi in un periodo di regolare decrescenza periodica dopo l'ultima esacerbazione del 1900.

Ma già a prima vista risalta subito nelle due figure 1 e 2 che le *curve della mortalità assai più bruscamente discesero dal 1902 in poi.*

Risalta pure che *le recrudescenze periodiche della mortalità non si sono più finora verificate;* e un tentativo a rielevarsi che ci fu nel 1904-05 (v. fig. 2), quando si sarebbe, di regola, dovuto riverificare, sembra come schiacciato da una causa che non agiva nel periodo antecedente.

Che se l'andamento della mortalità avesse continuato come prima di subire una nuova e così energica influenza, si sarebbe dovuto aspettare parecchio (circa 25 anni) per raggiungere il minimo di circa 5000 morti nel 1906, che quasi tutti (v. fig. 2 e tab. 2) s'ebbero a lamentare nell'Italia meridionale e insulare ad onta delle precipitose diminuzioni ivi pure avvenute.

Guardando anche i *valori minimi delle oscillazioni periodiche* prima e dopo l'avvento del chinino di Stato possiamo ricavarne considerazioni non prive di interesse.

L'ampiezza delle oscillazioni della mortalità fra massimi e minimi può dirci in qual misura approssimativa dimiminuisce la mortalità dopo anni di recrudescenza epidemica.

Applichiamo questa considerazione alla grafica per l'Italia meridionale (fig 2). Abbiamo:

Differenza fra il massimo	1887	e il minimo	1890	=	3946
Id.	id.	1891	id.	1894 =	2440
Id.	id.	1895	id.	1899 =	4116
Id.	id.	1900	id.	1906 =	5610

L'ultima differenza, che rappresenta l'oscillazione fra l'ultimo massimo del periodo precedente al chinino di Stato, e l'ultimo minimo del periodo susseguente al chinino di Stato, supera di un migliaio e mezzo la massima fra le precedenti differenze.

E per l'Italia insulare:

Differenza fra il massimo	1887	e il minimo	1892	=	2423
Id.	id.	1894	id.	1898 =	1937
Id.	id.	1900	id.	1906 =	3922

Anche qui troviamo un migliaio e mezzo più che la massima delle precedenti differenze.

Certamente se si guardano le figure 1 e 2 risalta la tendenza, diciamo così naturale o spontanea, che le curve della mortalità hanno dal 1887 in poi verso la discesa. Ma nessuno in buona fede può negare che dal 1902 in qua non sia intervenuto un fatto nuovo a modificare profondamente, cioè a rendere più precipitosa la discesa della mortalità per malaria in tutta Italia e nelle stesse regioni che n'erano più infestate.

Anche nelle regioni dove (v. fig. 2, parte inferiore) era già in continua, progressiva attenuazione, è pure notevolmente e stabilmente diminuita.

Che non v'abbia influito il *chinino consumato dall'industria privata* lo prova la fig. 1 dimostrando come esso dopo il 1902 sia rimasto quasi stazionario, mentre il chinino di Stato giunse a pareggiarlo e quindi in totalità a duplicare il consumo dell'eroico rimedio.

All'influenza delle *bonificazioni idrauliche* che per difficoltà locali e per mancanza di tecnici procedono così a rilento non è neppur da pensare.

All'influenza dell'*attenuazione spontanea dell'epidemia* può e dev'essere, con sufficiente esattezza, assegnato il valore che, a misura delle oscillazioni precedenti, le spetta come una causa prima del progressivo abbassamento della mortalità. Ma dell'abbassamento stesso molto più precipitoso, nonchè della scomparsa o almeno ritardata recrudescenza periodica non può non attribuirsi il valore di una potente concausa all'avvento del *chinino di Stato* e alla sua diffusione progressiva.

Del resto chi può negare che il chinino è così potente specifico, e che di malaria muore chi non ne prende in tempo e abbastanza? Quindi il danno e l'onta della mortalità per malaria devono cedere dinnanzi al progressivo avanzare del chinino di Stato in ogni landa e in ogni tugurio ove la mancanza del farmaco sovrano tratteneva e trattiene la morte per malaria (1).

Se poi si tien conto che ancora nel 1904 il 42.8 % circa dei nostri morti di malaria decimava la prima età sotto i 5 anni, sin oggi disgraziatamente (v. pag. 455) tagliata fuori dai benefici della nuova industria di Stato, si può con certezza presagire che coi nuovi preparati chinacei aggradevoli ai bambini *si potrà, quando si voglia, ottenere un ulteriore abbassamento* sia nella mortalità generale per malaria, sia nella mortalità per enterite, che nei tempi e luoghi malarici diventa più diffusa e più letale.

Per un *confronto fra la morbosità per malaria e il chinino di Stato* le più sicure notizie possiamo ricavarle dagli ospedali di Roma (v. fig. 3), ove risulta che, dopo introdotta nella campagna romana la profilassi chininica, la nota legge della recrudescenza periodica regolare ha continuato il suo corso.

Ma, pur avendo avuto nel 1905 un nuovo massimo, tuttavia il rapporto fra questo massimo ed il suo precedente fu di

$$\frac{3991}{6187} = \frac{64.5}{100},$$

cioè d'un valore molto lontano dal rapporto $\frac{87.6}{100}$ fra i due massimi anteriori all' inizio della profilassi (v. pag. 862); molto lontano

(1) Secondo Vassal, anche nell'Isola Reunione (v. pag. 433) con la cura preventiva degli indenni e il trattamento prolungato dei malarici è cessata la mortalità per malaria.

quindi da quel coefficiente medio di $\frac{90}{100}$, che ha regolato dal 1887 al 1902 lo scemare graduale dei massimi tanto della mortalità quanto della morbosità.

Che se negli ospedali di Roma il massimo di morbosità, quale fu nell'anno 1905, avesse corrisposto a ciò che il così regolare andamento epidemiologico precedente faceva congetturare, si sarebbero avuti circa 5560 malati, invece dei 3991 che ci furono, e che di regola non prima di altri 8 anni circa si sarebbero potuti avere.

Notisi poi che negli ultimi anni è molto cresciuta la popolazione lavoratrice di campagna e del suburbio, ed è cresciuta eziandio del 25-30 % la popolazione ospedaliera.

A raggiungere questa più sollecita diminuzione di infermi per malaria e il conseguente risparmio di spese di ospedalità nessuno in buona fede può negare che non v'abbia influito la diffusione della profilassi chininica, d'anno in anno più estesa, come si vede nella 2ª riga della tabella 13 e nella parte inferiore della fig. 3.

TABELLA XIII.

Chinino di Stato e malaria nell'Agro Romano.

	1900	1901	1902	1903	1904	1905	1906
Profilassati nell'Agro Romano. . .	....	1,176	3,853	17,506	29,693	38,429	42,726
Infezioni primitive curate dalla Croce Rossa	1,716 (17 %)	1,263 (16 %)	764 (7 %)	320 (2 %)	162 (1.34 %)	250 (1.52 %)	129 (0.77 %)
Malarici curati dalla Croce Rossa.	3,751 (31 %)	2 366 (26 %)	2,581 (20 %)	1,547 (11 %)	1,406 (10 %)	839 (5.1 %)	576 (3.4 %)
Malarici ricoverati negli Ospedali di Roma	6,186	4.725	2,750	2,461	2.961	3,991 (a)	2,518

(a) Anno di recrudescenza periodica dell'epidemia.

TABELLA XIV.

La malaria nell'esercito.

Anni	Malarici ‰ di forza	*Osservazioni*
1901	49.94	. . . .
1902	36.52	. . . .
1903	27.24	Inizia la profilassi chininica.
1904	19.21	Continua la profilassi chininica.
1905	28.00 (*a*)	Id.
1906	18.94	Si estende la profilassi chininica.

(*a*) Anno di recrudescenza periodica dell'epidemia.

Qualcosa di simile agli ospedali di Roma accadde nelle ferrovie adriatiche (v. tab. 6) e nell'esercito (v. tab. 14); nell'uno e nelle altre la recrudescenza periodica del 1905 si riaffacciò, ma fu, si può dire, tenuta bassa.

Così nell'Agro Romano, come nell'esercito e nelle ferrovie, la profilassi chininica si è sempre più estesa; ma quanti ancora vi sfuggono o regolarmente non vi sottostanno?

Dove questa è meglio vigilata e disciplinata, i suoi effetti sono più evidenti non solo nei ristretti nostri campi dimostrativi (vedi tab. 4 e 5), ma eziandio su più vasta scala.

Ad es., nella popolazione profilassata dalla Croce Rossa nell'Agro Romano (v. tab. 13, 3ª e 4ª riga) dal 1900 in poi man mano la profilassi fu generalizzata, le infezioni primitive si abbassarono dal 16-17 % al 0.77 e i malarici curati dal 31 % scesero al 3.4 % della popolazione così salvaguardata dalle febbri, e la recrudescenza periodica del 1905 nelle rispettive zone dell'Agro Romano non fu avvertita.

Lo stesso dicasi per Vigasio, Pontepossero, Stroppiana, Pezzana, Candia Lomellina, Mantova, Milano, dove più energica e continuativa fu l'opera dei nostri soci più zelanti e costanti.

Quindi è possibile anche in un esteso territorio diminuire mediante il chinino profilattico la stessa morbosità per malaria.

Il giorno in cui liberata da ogni diffidenza e negligenza in alto ed in basso, la profilassi chininica delle infezioni malariche primi-

tive e recidive, qual è nella nostra legge così entrerà nell'organizzazione sanitaria, e qual è nell'Agro Romano e Pontino e in non molti altri luoghi così penetrerà nei costumi di tutta la popolazione agricola soggetta alla febbre, si può fondatamente sperare che non solo la mortalità ma eziandio la morbosità per malaria vengano sottratte alla ferrea legge di quel fato epidemico, che pochi anni or sono pareva indomabile.

Guardiamoci però da ogni semplicismo e da soverchie illusioni. La malaria è un nostro secolare nemico. La vittoria contro di lui non sarà che il premio di lunga, assidua guerra, preparata specialmente in tempo di relativa pace epidemica siccome quello che ora corre, ben coordinata fra il centro e la periferia, tra il Governo e tutti gli Enti locali, e potentemente coadiuvata dalla partecipazione degli idraulici, degli agricoltori, degli ufficiali sanitari e medici condotti, e di ogni uomo di buona volontà per una missione così piena di abnegazione e sacrificio, per una vera e grande opera umanitaria e sociale.

N. — Conclusioni profilattiche.

La campagna antimalarica del 1906 ha sempre più dimostrato che la teoria anofelica coi suoi postulati vecchi (bonifiche idrauliche) e nuovi (distruzione delle zanzare o almeno difesa dalle loro punture) non può sopra estesi territori condurre a pronti successi nella guerra alla malaria.

E' invece assai più facile utilizzare sempre più e sempre meglio l'antico e sempre sovrano rimedio contro i parassiti stessi della malaria. Così avvenne che durante il 1906 la mortalità per malaria in Italia arrivò appena ai 5 mila morti, e dal 1900 ad oggi si è progressivamente e precipitosamente abbassata di due terzi.

Si può indubbiamente dimostrare che di così grande successo fu concausa potentissima il chinino dello Stato, e si può senza fallo presagire che quando con adatti preparati chinacei verranno a salvarsi anche i bambini, la mortalità per malaria si ridurrà prontamente ai minimi termini.

Non solo poi in ristretti campi dimostrativi ma eziandio per tutta una popolazione si può dimostrare che l'uso del chinino stesso, a scopo preventivo, diminuisce di molto anche la morbosità per malaria.

I risultati finora ottenuti non devono però illuderci, ma spronarci sempre più ad appositamente migliorare la nostra organizza-

zione sanitaria, e a coordinare all'opera del medico quella dell'idraulico e dell'agricoltore bene indirizzandole verso il definitivo e duraturo trionfo sul nemico sempre formidabile del nostro territorio.

Ma già si può iniziare la colonizzazione del nostro latifondo anche più inospitale, perchè oggi e subito quando si voglia vi si può mantener l'uomo preservato dalle febbri mediante l'uso quotidiano regolare del chinino, e, quando è possibile, mediante anche l'abitazione difesa dalle zanzare malefiche.

Così cade anche il più arduo ostacolo che finora si opponeva alla colonizzazione delle regioni tropicali.

Intanto possiamo esser lieti che le nostre norme e leggi per la più larga diffusione popolare del chinino nelle forme più aggradevoli e ad uso anzitutto profilattico, sono riconosciute pratiche e sono sempre più imitate anche fuori d' Italia.

ISTITUTO D'IGIENE DELLA R. UNIVERSITÀ DI SASSARI

Studio sul potere immunizzante verso la rabbia della sostanza nervosa normale confrontato a quello della sostanza nervosa rabica

per il prof. CLAUDIO FERMI.

Secondo lo stato attuale della scienza, la sostanza nervosa normale sarebbe sprovvista di qualsiasi potere immunizzante contro la rabbia. Infatti, se Babes mediante iniezioni di sostanza nervosa normale, salvò due cani infettati di virus fisso sottodura, i vari altri sperimentatori che controllarono questa ricerca con un forte numero di animali, ottennero risultati completamente negativi.

Ecco brevemente l'esperienza del Babes e quelle dei suoi contraddittori.

ESPERIENZA DI BABES (1). — A 3 cani infettati sotto dura di virus fisso si iniettarono 5 cmc. al giorno per 10 giorni di un'emulsione di cervello di montone.

Risultato. — Uno dei 3 cani morì con un periodo d'incubazione di 20 giorni e due sopravvissero. Il cane di controllo soccombette dopo 15 giorni (!).

Ora, come si vede, un'esperienza su tre cani è un po' poco per risolvere una sì difficile ed importante questione, come quella in discorso; tanto più che uno degli animali morì, e che quello di controllo soccombette nientemeno dopo 15 giorni, cosa non frequente in animali infettati sotto dura di virus fisso.

(1) BABES. *Sur le traitement de la rage par l'injection de substance nerveuse normale.* — Comptes-rendus de l'Académie des sciences, vol. 126, pag. 986, 1898.

Si aggiunga a ciò che nei conigli l'A. ottenne risultati molto incerti e anche negativi.

Questi risultati del Babes, ripeto, vennero distrutti completamente dalle esperienze di Auyeski, Calabrese, Galavielle e Rimbaud.

Esperienze di Auyeski (1). — A 5 cani si fecero 2 iniezioni al giorno di 10 cmc. ciascuna per 18 giorni, di emulsione di midollo di bue sano, e poscia si infettarono col virus di passaggio per via endoculare, dopo di che si continuò l'immunizzazione come sopra per altri 14 giorni, iniettando nei 32 giorni, 30 gr. di midollo a ciascun cane.

Risultato. — Gli animali sopravvissero ad una prima infezione, ma soccombettero poscia ad una seconda.

Come si vede, e come asserisce lo stesso Auyeski, il risultato è stato completamente negativo, quantunque l'A. abbia trattato i suoi animali con una quantità di vaccino nientemeno che 13 volte maggiore di quella adoperata dal Babes.

Difatti, se non erro, mentre il Babes avrebbe iniettato in 10 giorni ad ogni cane 50 cmc. di vaccino, l'Auyeski in 32 giorni ne avrebbe iniettato 640. Si noti poi che questo A. non scelse la via subdurale, come fece il Babes, ma la via endoculare.

L'avere i cani dell'Auyeski sopportata la prima infezione endoculare, non ha molto valore, perchè qualche volta ciò accade anche nei controlli.

Non dimentichiamo poi che questo A. ottenne nei conigli risultato completamente negativo. Quindi non è da meravigliarsi se egli negò qualunque valore ai due risultati positivi ottenuti dal Babes.

Esperienze di Calabrese (2). — Questo A. infettò i suoi animali con virus di passaggio per via endoculare e poscia li trattò per 3 e 10 giorni con 0,5-1 gr. di sostanza nervosa normale per chilogr. d'animale, e trattò precisamente 12 conigli con emulsione di cervello di pecora, 10 conigli con cervello di coniglio e 5 conigli e 3 cani con cervello di cane.

Il risultato ottenuto dal Calabrese fu totalmente negativo: tutti gli animali morirono di rabbia.

---

(1) Auyeski. *Ueber Immunisierung gegen Wut mit normaler Nervensubstanz.* — Centrabl. f. Bakt., 1900, vol. 27, p. 5.
— *Immunisierung gegen Tollwut mit normaler Hirnsubstanz.* — Orvosi Hetilap., n. 44, p. 554.
— *Erwiderung auf die Bemerkungen der Herrn Prof. Babes über die Beeinflussung der Wut durch normale Nervensubstanz.* — Centralbl. für Bakt., vol. 28, 1900, p. 177.

(2) Calabrese. Semaine méd., 1899, p. 39. — Clinica moderna, 11 e 12 gennaio.

ESPERIENZE DI GALAVIELLE E RIMBAUD (1). — Questi due AA. iniettarono per la via sottocutanea e peritoneale a 8 conigli, nel periodo di 11 giorni, 3 cmc. al giorno di emulsione di midollo di montone, ed a 2 cani iniettarono la stessa emulsione per 12 giorni in ragione di 5 cmc. per giorno. Ciò fatto, infettarono gli 8 conigli parte di virus fisso e parte di virus di strada per la via sottodurale ed i cani per la via endoculare.

Il risultato ottenuto fu che tutti gli animali soccombettero di rabbia e che si ebbe soltanto un ritardo di qualche giorno negli animali infettati di virus di strada.

Per altro, tanto le esperienze del Babes come quelle dei suoi oppositori, non potevano risolvere la questione che stiamo trattando, per la ragione che detti AA., mancando di animali recettivi alla rabbia per via sottocutanea, furono costretti a sperimentare soltanto su animali infettati per la via subdurale ed endoculare, contro la quale, come si sa, è quasi sempre impotente anche lo stesso vaccino Pasteur. Basta infatti passare in rivista le esperienze di immunizzazione istituite con questo vaccino, per convincersene pienamente.

ESPERIENZE DI FRISCH:

15 conigli infettati sotto dura di virus di strada e vaccinati mediante 14 iniezioni di vaccino Pasteur dal M. 15 al M. 1 morirono tutti di rabbia insieme ai controlli.

3 cani infettati sotto dura di virus di passaggio e poscia vaccinati col vaccino Pasteur morirono tutti e 3 insieme ai 2 controlli.

13 conigli vaccinati col vaccino Pasteur dal M. 15 al M. 1 e poscia infettati di virus di strada sotto dura, morirono tutti di rabbia.

ESPERIENZE DI HÖGYES:

6 cani infettati sotto dura di virus di strada e trattati col vaccino Högyes, morirono tutti insieme ai 3 controlli.

16 conigli e 8 cani infettati sotto dura di virus di strada e di virus di passaggio, e vaccinati col vaccino Pasteur dal M. 10 al M. 1, morirono tutti meno uno.

5 cani vaccinati col vaccino Högyes e poscia infettati sotto dura di virus fisso, morirono tutti di rabbia.

Celli e De Blasi ottennero pure risultati totalmente negativi. Lo stesso dicasi di De Renzi, Kraus, Keller e Clairmont.

Di 14 cani infettati sotto dura di virus di strada e di virus fisso e da me trattati col vaccino Pasteur anche per 20 e 30 giorni, non se ne salvò nessuno.

Le ricerche quindi istituite sin qui sulla sostanza nervosa normale dimostrano soltanto che questa non esercita un potere immunizzante superiore alla sostanza nervosa rabica.

---

(1) GALAVIELLE e RIMBAUD. Montpellier médical, vol. XXIII, 1906.

Ora, indipendentemente dalle ricerche del Babes e dei suoi contraditori, alcuni fatti fecero nascere in me il sospetto che gran parte del potere immunizzante del vaccino Pasteur sia invece da ascrivere alla sostanza nervosa normale.

Detti fatti sarebbero i seguenti:

1° che tutti i vaccini antirabici sin qui usati nell'uomo e negli animali, quantunque preparati in modo talora molto differente, dettero risultati pressochè uguali. Così il vaccino Pasteur ottenuto mediante il disseccamento del virus, il vaccino Ferran preparato col virus fisso fresco, il vaccino Högyes preparato pure col virus fisso fresco, ma molto diluito, il vaccino Puscariu preparato col virus fisso riscaldato a varie temperature (80°-30° per 10′), il vaccino Valli, Centanni preparato trattando il virus col succo gastrico.

Io pure ho potuto dimostrare che il potere vaccinante è presso a poco eguale, sia che si tratti il virus fisso con composti di mercurio (sublimato, ermofenile), con composti d'argento (argento colloidale, protargolo, actolo) oppure con colori di anilina (larycith, bleu di metilene), con timolo o con acido fenico;

2° che non esiste una vera tossina rabica, ciò che del resto si accorderebbe colla probabile natura del virus. Infatti il potere leggermente tossico della sostanza nervosa rabica, è pressochè uguale a quello della sostanza nervosa normale;

3° che lo stesso grado di iperleucocitosi che si riscontra nel sangue degli animali trattati con sostanza nervosa rabica, si osserva pure in quelli trattati con sostanza nervosa normale.

Ciò ho potuto constatarlo anch'io in esperienze istituite sui cani, conigli e ratti.

Il siero di cani immunizzati con sostanza nervosa normale e rabica (1 % iniettato 2 volte al giorno per 5 o per 4 giorni in ragione di ¼ di cmc. per iniezione), salvò 1 su 2 degli animali infettati di virus fisso, principiando il trattamento 24 ed anche 48 ore dopo l'infezione.

Il trattamento fu invece totalmente inefficace principiandolo 3 giorni dopo l'infezione, vale a dire 2 giorni avanti la comparsa dei primi sintomi.

Gli stessi sieri salvarono invece i muridi anche dopo 3, 6 e persino 8 giorni dalla praticata infezione di virus di strada.

La mescolanza a parti uguali di siero di cane immunizzato con sostanza nervosa normale e rabica ed emulsione fenicata di virus fisso iniettata 2 volte al giorno per 5 giorni in ragione di ¼ di cmc. per iniezione, salvò gli animali infettati di virus fisso principiando il trattamento anche 24 ore dopo l'infezione.

Principiando invece 48 ore dopo, vale a dire circa 3 giorni avanti la comparsa dei primi sintomi, si salvò soltanto 1 su 2 degli animali.

Il trattamento fu invece totalmente inefficace principiandolo 3 giorni dopo l'infezione, vale a dire 2 giorni avanti la comparsa dei primi sintomi.

Volendo ora risolvere l'interessante quistione era indispensabile sperimentare su di un forte numero di animali sicuramente recettivi al virus fisso ed al virus di strada per la via sottocutanea, bisognava confrontare le dosi minime immunizzanti delle due sostanze, l'efficacia dei sieri ottenuti dagli animali trattati con sostanza nervosa normale e rabica, ecc., ciò che appunto ho cercato di fare nel presente lavoro.

Le mie esperienze quindi vennero istituite secondo il seguente prospetto:

I. Azione immunizzante delle sostanze nervosa normale e rabica fresche iniettate per la via ipodermica.

II. Confronto coll'azione di altri organi normali.

III. Azione immunizzante della sostanza nervosa normale e rabida in forte diluizione iniettata per via ipodermica.

IV. Influenza del disseccamento sul potere immunizzante della sostanza nervosa normale e rabica iniettata sotto cute.

V. Confronto del potere immunizzante dell'emulsione fenicata di encefalo fresco di agnello sano 5 % col vaccino Pasteur.

VI. Influenza del riscaldamento a 100°, 98°, 75° C. sul potere vaccinante della sostanza nervosa normale e rabica.

VII. Potere immunizzante della sostanza nervosa normale e rabica sottoposta all'azione del succo gastrico naturale ed artificiale.

VIII. Potere immunizzante della sostanza nervosa normale e rabica somministrata per ingestione.

IX. Potere immunizzante della sostanza nervosa normale e rabica, trattata con acido cloridrico 3 ‰, somministrata per ingestione.

X. Azione immunizzante della sostanza nervosa normale e rabica somministrata per la via endorettale.

XI. Azione immunizzante del siero di cani trattati con una emulsione fenicata di sostanza nervosa normale e rabica.

XII. Azione immunizzante del siero di cani, trattati con sostanza nervosa normale e rabica, iniettato dopo vario tempo dalla praticata infezione di virus fisso.

XIII. Azione immunizzante del siero di cani trattati con sostanza nervosa normale e rabica, iniettato dopo vario tempo dalla praticata infezione di virus di strada.

XIV. Potere immunizzante del siero di sangue di animale sano.

XV. Potere immunizzante del siero di animali immunizzati con sostanza nervosa normale e rabica mescolate al vaccino.

XVI. Azione neutralizzante del siero di animali immunizzati (con una emulsione fenicata di sostanza nervosa normale e rabica) sul virus fisso fresco *in vitro*.

XVII. Differenze tra il potere immunizzante della sostanza nervosa normale secondo la specie dell'animale.

Veniamo ora allo svolgimento dei singoli argomenti.

I. — Azione immunizzante della sostanza nervosa fresca normale e rabica 10 per cento iniettate per via ipodermica.

I. Serie.

a) *Sostanza nervosa normale di agnello.*

Esperienza I. 18 maggio 1906. — A 3 ratti neri infettati di virus di strada sotto cute si fanno subito 2 iniezioni al giorno di 1 cmc. l'una, per 20 giorni, iniettando in tutto 40 cmc., di emulsione di cervello sano di agnello 10 % con acido fenico 1 %.

Risultato. — Gli animali sopravvivono tutti.

Esperienza di controllo. 18 maggio 1906. — S'iniettano con virus di strada, 2 ratti neri,

Risultato. — Uno degli animali presenta paralisi il 29 maggio e muore di rabbia il 30 maggio, cioè dopo 12 giorni; l'altro presenta paralisi il 26 maggio e muore lo stesso giorno, cioè dopo 15 giorni dalla inoculazione.

Esperienza II. 25 luglio 1906. — A 10 ratti neri, infettati di virus di strada sotto cute, si fanno subito 2 iniezioni al giorno di 1 cmc. l'una per 15 giorni, iniettando cioè in tutto 30 cmc. di una emulsione di cervello sano di agnello 10 % più acido fenico 1 %.

Risultato. — Un ratto muore senza paralisi dopo due giorni; un altro muore dopo 17 giorni senza sintomi rabici e tutti gli altri otto animali sopravvivono.

Esperienza III. 7 settembre 1906. — A 10 ratti bianchi, infettati di virus di strada sotto cute, si fanno subito 2 iniezioni al giorno di 1 cmc. l'una per 15 giorni, iniettando cioè in tutto 30 cmc., di una emulsione di cervello sano di agnello 10 % più acido fenico 1 %.

Risultato. — Gli animali sopravvivono tutti. Il 4 febbraio 1907 si infettano di virus fisso sottocute e sopravvivono ancora.

Esperienza IV. 22 maggio 1907. — A 5 ratti albini infettati di virus di strada sotto cute si fanno due iniezioni al giorno di 1 cmc. per 15 giorni

di un'emulsione fenicata 1 % di encefalo fresco di agnello sano 5 %, iniettando in tutto 30 cmc. di emulsione.

Risultato. — Uno degli animali fu trovato morto dopo un mese, cioè il 22 giugno e gli altri sopravvivono.

Esperienza V. 1° luglio 1907. — A 10 ratti bianchi, infettati sotto cute di virus di strada, si fanno subito due iniezioni al giorno di 1 cmc. l'una per 15 giorni, iniettando così 30 cmc. di cervello fresco di agnello sano.

Risultato. — Gli animali sopravvivono tutti meno due che presentano paralisi l'uno il 18 luglio alle 4 pom., l'altro il 19 luglio alle 7 ant., e muoiono rispettivamente il 19 luglio alle 7 ant. e il 20 luglio 7 ant.

Se la leggiera inferiorità dei risultati di queste due esperienze si debba attribuire alla maggior diluizione del vaccino (5 % invece che 10 %) è da dimostrare.

1ª Esperienza di controllo. 7 settembre 1906. — S'infettano 5 ratti neri sotto cute con virus di strada senza poi immunizzarli.

Risultato. — Gli animali restano paralizzati il 17 settembre alle ore 5 di sera e muoiono tutti di rabbia il 18 settembre alle 7 di mattina, cioè dopo 11 giorni.

2ª Esperienza di controllo. 1° luglio 1907. — Cinque ratti bianchi vengono infettati di virus di strada sotto cute senza essere poi immunizzati.

Risultato. — Tre degli animali restano paralizzati il 15 luglio alle 4 pom. e muoiono il 18 luglio alle 7 ant., cioè dopo 18 giorni; un altro resta paralizzato il 16 luglio ore 9 ant. e muore il 17 luglio ore 10 ant., cioè dopo 17 giorni; l'altro presenta paralisi il 19 luglio ore 9 pom. e muore il 22 luglio ore 7 ant.

b) *Sostanza nervosa rabica.*

Esperienza I. 25 maggio 1906. — A 3 ratti bianchi ed uno nero infettati di virus di strada sotto cute si fanno subito 2 iniezioni al giorno di 1 cmc. l'una per 14 giorni, cioè in tutto 28 cmc. di una emulsione di cervello rabido di coniglio al 10 % e acido fenico 1 %.

Risultato. — I 3 ratti bianchi sopravvivono. Il ratto nero presenta paralisi il 10 giugno e muore l'11 giugno, cioè dopo 17 giorni.

Esperienza di controllo. 25 maggio 1906. — S'iniettano sotto cute 4 ratti bianchi con virus di strada senza poi immunizzarli.

Risultato. — Un ratto muore di rabbia il 6 giugno, cioè dopo 12 giorni; un altro muore senza paralisi il 2 giugno, cioè dopo 8 giorni; gli altri 2 presentano paralisi il 6 giugno sera e muoiono il 7 giugno mattina, cioè dopo 13 giorni.

II Serie.

a) *Sostanza nervosa normale di ratti.*

Esperienza. 22 giugno 1907. — A 5 ratti neri infettati di virus di strada sotto cute si fanno subito 2 iniezioni al giorno di 1 cmc. l'una per 15 giorni iniettando in tutto 30 cmc. di un'emulsione al 5 % fenicata all'1 % di encefalo di ratti sani.

Risultato. — Tutti gli animali sopravvivono

Esperienza di controllo, 22 giugno 1907. — Due ratti neri vengono infettati di virus di strada sotto cute.

Risultato. — Gli animali presentano paralisi l'11 luglio alle 7 ant. e muoiono il 12 luglio 4 pom.

b) *Sostanza nervosa rabica di ratti.*

Esperienza. 22 giugno 1907. — A 5 ratti neri infettati di virus di strada sotto cute si fanno subito 2 iniezioni al giorno di 1 cmc. l'una per 15 giorni, iniettando in tutto 30 cmc. di un'emulsione al 5 % di encefalo di ratti rabidi.

Risultato. — Quattro dei ratti furono trovati morti per causa ignota rispettivamente il 9 luglio alle ore 7 ant., il 10 luglio 7 ant., il 13 luglio 4 ½ pom. e il 23 luglio 7 ant. L'altro sopravvive.

Conclusione. — Il potere immunizzante dell'emulsione di sostanza nervosa normale non fu inferiore a quello della sostanza nervosa rabica. Difatti di 26 ratti infettati di virus di strada sotto cute e poscia vaccinati con sostanza nervosa normale di agnelli e di ratti, ne morirono 2, salvandosene quindi il 96, 7 %; invece dei 9 ratti vaccinati con sostanza nervosa rabbica, ne morirono 4, 1 di rabbia e 3 per causa ignota. Notisi però che questi 3 essendo morti dopo 17, 18 e 21 giorni potrebbero essere anche periti di rabbia, mentre i controlli, in numero di 18, perirono tutti.

II. — Confronto coll'azione di altri organi normali.

Onde orientarmi sulla specificità dell'azione immunizzante della sostanza nervosa, provai l'azione immunizzante di altri organi, scegliendo quelli ricchi di lecitina come la sostanza nervosa, quali appunto sono i testicoli. Lo sperma infatti contiene il 18 % di questa sostanza.

Esperienza I. 7 settembre 1906. — A 10 ratti bianchi, iniettati sotto cute di virus di strada, si fanno subito 2 iniezioni al giorno di 1 cmc. l'una

per 10 giorni iniettando in tutto 20 cmc. di una emulsione fenicata di testicoli di montone sano 10 %.

Risultato. — Gli animali restano paralizzati il 18 settembre e muoiono tutti di rabbia il 19 settembre, cioè dopo 12 giorni.

Esperienza di controllo. 7 settembre 1906. — S'iniettano 5 ratti bianchi sotto cute con virus di strada.

Risultato. — Gli animali restano paralizzati il 18 settembre e muoiono tutti di rabbia il 19 settembre, cioè dopo 12 giorni.

Esperienza II. 1 ottobre 1906. — A 10 ratti bianchi, iniettati sotto cute di virus di strada, si fanno subito 2 iniezioni al giorno di 1 cmc. l'una per 15 giorni, iniettando in tutto 30 cmc. di una emulsione fenicata di testicoli sani di montone al 10 %.

Risultato. — Gli animali restano paralizzati il 10 ottobre alle 7 di mattina e muoiono tutti di rabbia l'11 ottobre, cioè dopo 10 giorni.

Esperienza di controllo. 1° ottobre 1906. -- S'iniettano sotto cute 2 ratti bianchi di virus di strada.

Risultato. — Gli animali restano paralizzati il 10 ottobre e muoiono di rabbia l'11 ottobre, cioè dopo 10 giorni.

Conclusione. — Da queste esperienze risulta che l'emulsione di testicoli non esercita alcun potere immunizzante contro la rabbia.

Difatti 20 ratti infettati di virus di strada sottocute e poscia trattati con emulsione fenicata di testicoli normali 10 %, per 15 giorni, morirono tutti di rabbia insieme ai controlli.

III. — Azione immunizzante della sostanza nervosa normale e rabida in forte diluizione iniettata sotto cute.

Un'altra via per decidere se esistevano differenze nel potere immunizzante delle due sostanze nervose in discorso, mi parve quella di determinare la dose minima e rispettivamente la diluizione massima delle due sostanze capaci ancora di immunizzare.

A questo scopo, in una prima serie di ricerche, esperimentai le stesse due sostanze nella diluizione all' 1 ‰ ed in una seconda serie di esperienze provai le diluizioni dall' 1:10,000 all' 1:40,000.

I. Serie.

a) *Sostanza nervosa normale all' 1 ‰.*

Esperienza. 27 novembre 1906. — A due ratti, infettati di virus di strada sotto cute, si fanno 2 iniezioni al giorno per 15 giorni di 1 cmc. per iniezione di emulsione di cervello di agnello sano 1 ‰ contenente acido fenico al ½ %, iniettando in tutto a ciascuno 30 cmc. di detta emulsione.

Si ripete lo stesso trattamento a un terzo, soltanto che a questo si fanno iniezioni di 2 cmc. iniettando in tutto 60 cmc. di detta emulsione.

Risultato. — Uno dei due ratti, inoculati con 30 cmc. di vaccino, muore il 18 dicembre, cioè dopo 21 giorni non di rabbia. Gli altri 2 sosopravvivono; vivevano ancora il 27 marzo.

b) *Sostanza nervosa rabica all' 1 °/₀₀.*

ESPERIENZA. 27 novembre 1906. — A due ratti neri infettati di virus strada sotto cute si fanno 2 iniezioni al giorno sotto cute per 15 giorni di 1 cmc. per iniezione di virus fisso 1 °/₀₀ contenente acido fenico al ½ % iniettando in tutto a ciascuno 30 cmc. di vaccino.

Si ripete lo stesso trattamento a un terzo, ma a questo si fanno iniezioni di 2 cmc. iniettando in tutto 60 cmc. di vaccino.

Risultato. — Tutti gli animali sopravvivono. Vivevano ancora il 27 marzo.

ESPERIENZA DI CONTROLLO. — Due ratti neri vengono infettati il 27 novembre di virus di strada sotto cute.

Risultato. — Uno dei ratti presenta paralisi il 12 dicembre e muore di rabbia il 14 dicembre ore 9 ant, cioè dopo 17 giorni: l'altro presenta paralisi il 13 dicembre e muore di rabbia il 15 dicembre ore 8 ant., cioè dopo 18 giorni.

II SERIE.

a) *Sostanza nervosa normale diluita all' 1 : 10,000 — 40,000.*

ESPERIENZA I. 14 dicembre 1906. — A 2 ratti neri infettati di virus di strada sotto cute, si fanno 2 iniezioni al giorno sotto cute per 15 giorni di 1 cmc. ciascuna di emulsione di cervello di agnello sano all'1 : 10,000 contenente acido fenico al ½ %, iniettando in tutto a ciascuno 30 cmc. di emulsione.

Risultato. — Uno dei ratti presenta paralisi il 4 gennaio, ore 8 antimeridiane, e muore lo stesso giorno di rabbia alle ore 7 pomeridiane, cioè dopo 21 giorni. L'altro sopravvive. Iniettato altre 2 volte, il 4 febbraio e il 15 febbraio 1907, di virus fisso sopravvive pure. Viveva ancora il 27 marzo.

ESPERIENZA II. 14 dicembre 1906. — Due ratti neri infettati di virus di strada sotto cute, si trattano come sopra, ma usando una emulsione all'1 : 20,000.

Risultato. — Uno presenta paralisi il 26 dicembre ore 9 antimeridiane e muore di rabbia il 27 dicembre ore 7 pomeridiane. L'altro presenta paralisi il 2 gennaio e muore di rabbia il 4 gennaio.

ESPERIENZA III. 14 dicembre 1906. — Due ratti neri infettati di virus di strada sotto cute si immunizzano come sopra, ma usando una emulsione all'1 : 40,000.

Risultato. — Gli animali sopravvivono entrambi. Iniettati altre 2 volte, il 4 febbraio e il 15 febbraio 1907 di virus fisso sopravvivono pure. Vivevano ancora il 27 marzo.

Esperienza di controllo. — Due ratti neri vengono infettati di virus di strada sotto cute.

Risultato. — I 2 animali presentano paralisi il 26 dicembre e muoiono di rabbia il 27 dicembre.

b) *Sostanza nervosa rabica diluita all' 1 : 10,000 — 40,000.*

Esperienza I. 14 dicembre 1906. — A 2 ratti neri infettati di virus di strada si fanno 2 iniezioni al giorno sotto cute per 15 giorni di 1 cmc. per iniezione di virus fisso 1: 10,000 contenente acido fenico al ½ %, iniettando in tutto per ciascuno 30 cmc. di vaccino.

Risultato. — Uno degli animali presenta paralisi il 26 dicembre e muore di rabbia il 27 dicembre, cioè dopo 13 giorni.

L'altro sopravvive. Iniettato di virus fisso il 4 febbraio 1907, sopravvive. Iniettato una seconda volta di virus fisso, sopravvive pure. Viveva ancora il 27 marzo.

Esperienza II. 14 dicembre 1906. — Due ratti neri si infettano di virus di strada sotto cute e si immunizzano come sopra, ma usando una emulsione di vaccino all'1 : 20,000.

Risultato. — I 2 animali sopravvivono.

Si infettano altre 2 volte di virus fisso, il 4 febbraio ed il 15 febbraio 1907 e sopravvivono pure. Vivevano ancora il 27 marzo.

Esperienza III. 14 dicembre 1906. — Due ratti neri infettati di virus di strada sotto cute si immunizzano come sopra, ma usando una emulsione di vaccino all' 1 : 40,000.

Risultato. — Uno presenta paralisi il 3 gennaio e muore di rabbia il 4 gennaio, cioè dopo 20 giorni. L'altro sopravvive. Viveva ancora il 27 marzo.

III Serie.

a) *Sostanza nervosa normale diluita all' 1 : 10,000 — 40,000.*

Esperienza I. 17 gennaio 1907. — A 2 ratti neri infettati di virus di strada sotto cute si fanno 2 iniezioni al giorno sotto cute per 15 giorni di 1 cmc. per iniezione di emulsione di cervello di agnello sano all'1 : 10,000 contenente acido fenico al ½ %, iniettando in tutto per ciascuno 30 cmc. di emulsione.

Risultato. — Uno sopravvive e l'altro presenta paralisi il 2 febbraio ore 4 pomeridiane e muore il 3 febbraio ore 8 antimeridiane,

Esperienza II. 17 gennaio 1907. — Quattro ratti neri infettati di virus di strada sotto cute si immunizzano come sopra, ma usando una emulsione all' 1 : 20,000.

Risultato. — Uno muore per causa ignota il 21 gennaio, cioè dopo 4 giorni; un altro presenta paralisi il 2 febbraio e muore di rabbia il 3 febbraio. Gli altri due sopravvivono. Vivevano ancora il 28 marzo.

Esperienza III. 17 gennaio 1907. — Due ratti neri infettati di virus di strada sotto cute si immunizzano come sopra, ma usando una emulsione all'1 : 40,000.

Risultato. — Gli animali sopravvivono entrambi. Vivevano ancora il 28 marzo.

Esperienza di controllo. 17 gennaio 1907. — Due ratti vengono infettati di virus di strada sotto cute.

Risultato. — Presentano paralisi il 31 gennaio e muoiono l'1 febbraio.

b) *Sostanza nervosa rabica diluita all' 1 : 10,000 — 40,000.*

Esperienza I. 17 gennaio 1907. — A 2 ratti neri infettati di virus di strada sotto cute si fanno 2 iniezioni al giorno sotto cute per 15 giorni di 1 cmc. per iniezione di virus fisso all' 1 : 10,000 contenente acido fenico al ½ %, iniettando in tutto per ciascuno 30 cmc. di vaccino.

Risultato. — Uno dei ratti sopravvive. Viveva ancora il 28 marzo. L'altro presenta paralisi il 2 febbraio ore 8 antimeridiane e muore lo stesso giorno alle ore 6 pomeridiane, cioè dopo 16 giorni.

Esperienza II. 17 gennaio 1907. — Quattro ratti neri infettati di virus di strada sotto cute si immunizzano come sopra, ma usando una emulsione di vaccino all'1 : 20,000.

Risultato. — Uno presenta paralisi il 2 febbraio ore 8 antimeridiane e muore lo stesso giorno alle ore 6 pomeridiane, cioè dopo 16 giorni. Gli altri 3 sopravvivono. Vivevano ancora il 28 marzo.

Esperienza III. 17 gennaio 1907. — Due ratti neri infettati di virus di strada sotto cute si immunizzano come sopra, ma usando una emulsione di vaccino all'1 : 40,000.

Risultato. — Gli animali sopravvivono. Vivevano ancora il 28 marzo.

Esperienza di controllo. 17 gennaio 1907. — Due ratti neri vengono infettati di virus di strada sotto cute.

Risultato. — Presentano paralisi il 31 gennaio e muoiono il 1º febbraio.

IV Serie.

a) *Sostanza nervosa normale diluita all'1: 10,000-40,000.*

Esperienza I. 23 gennaio 1907. — A tre topolini albini infettati di virus di strada sotto cute, si fanno due iniezioni al giorno sotto cute per 15 giorni di $^1/_4$ di cmc. per iniezione di emulsione di cervello di agnello sano all'1 : 10,000 contenente acido fenico al ½ %, iniettando in tutto per ciascuno 7 ½ cmc. di emulsione.

Risultato. — Uno presenta paralisi il 5 febbraio, ore 10 ant. e muore di rabbia il 7 febbraio, ore 8 ant. Gli altri due sopravvivono. Vivevano ancora il 28 marzo.

ESPERIENZA II. 23 gennaio 1907. — Tre topolini albini infettati di virus di strada sotto cute, si immunizzano come sopra, ma usando una emulsione all'1 : 20,000.

Risultato. — Uno presenta paralisi il 15 febbraio, ore 7 ant. e muore il 16 febbraio, ore 8 ant. Gli altri due sopravvivono. Vivevano ancora il 28 marzo.

ESPERIENZA III. 23 gennaio 1907. — Tre topolini albini infettati di virus di strada sotto cute si immunizzano come sopra, ma usando una emulsione all'1 : 40,000.

Risultato — Gli animali sopravvivono. Vivevano ancora il 28 marzo.

b) *Sostanza nervosa rabica diluita all'1 : 10,000-40,000.*

ESPERIENZA I. 23 gennaio 1907. — A tre topolini albini infettati di virus di strada sotto cute, si fanno due iniezioni al giorno sotto cute per 15 giorni di $^1/_4$ di cmc. per iniezione di emulsione di virus fisso all'1 : 10,000 contenente acido fenico al ½ %, iniettando in tutto per ciascuno 7 ½ cmc. di emulsione.

Risultato. — Gli animali sopravvivono.

ESPERIENZA II. 23 gennaio 1907. — Tre topolini albini infettati di virus di strada sotto cute si immunizzano come sopra, ma usando una emulsione all'1 : 20,000.

Risultato. — Uno dei topolini presenta paralisi il 6 febbraio e muore il 7 febbraio e gli altri due sopravvivono.

ESPERIENZA III. 23 gennaio 1907. — Tre topolini albini infettati di virus di strada sotto cute si immunizzano come sopra, ma usando una emulsione all'1 : 40,000.

Risultato. — Un topolino presenta paralisi il 13 febbraio e muore il 14 febbraio e gli altri 2 sopravvivono.

ESPERIENZA DI CONTROLLO. 23 gennaio 1907. — Tre topolini vengono infettati di virus di strada sotto cute.

Risultato. — Uno presenta paralisi il 1° febbraio e muore il 3 febbraio. Gli altri presentano paralisi il 2 febbraio e muoiono il 3 febbraio.

Conclusione. – Da queste due serie di esperienze risulterebbe quindi:

1° Che la sostanza nervosa normale possiede un potere immunizzante, pressochè uguale a quella dell'emulsione di virus fisso, difatti:

a) dalla prima serie di esperienze risultò che di tre ratti immunizzati con emulsione di cervello di agnello sano (due iniezioni al giorno di 1 cmc. ciascuna per 15 giorni) e di altri tre immunizzati con emulsione di virus fisso nello stesso modo: nessuno morì di rabbia, mentre i controlli perirono tutti in 17 giorni;

b) dalla seconda serie di esperienze risultò poi che di 6 ratti immunizzati con emulsione di cervello di agnello sano (due iniezioni

al giorno di 1 cmc. ciascuna per 15 giorni) fortemente diluita, se ne salvarono 3; di altri 6 immunizzati con emulsione di virus fisso nello stesso modo, se ne salvò soltanto uno in più.

Questa piccola differenza potè essere anche accidentale;

c) dalla terza serie di esperienze risultò ancor più chiaramente che la sostanza nervosa normale possiede un potere immunizzante quasi uguale alla sostanza nervosa rabica: infatti mentre di 8 ratti immunizzati con emulsione di virus fisso (due iniezioni al giorno di 1 cmc. ciascuna per 15 giorni) all'1 : 10,000-20,000-40,000 se ne salvarono 6; di altri 7 ratti trattati con emulsione di cervello di agnello sano alla stessa diluizione se ne salvarono 5, e due morirono di rabbia;

d) infine dalla quarta serie di ricerche si ebbe che di 9 topolini albini trattati con emulsione di cervello di agnello sano diluito all'1 : 10,000-20,000 e 40,000 se ne salvarono 7, appunto come accadde di altri 9 topolini immunizzati con sostanza nervosa rabica.

2° Che l'emulsione di sostanza nervosa fu non solo attiva all'1 : 1000, ma anche all'1 : 40,000, proprio come l'emulsione di virus fisso.

3° Che il grado di diluizione esercita la sua importanza, imperocchè mentre si salvarono tutti e 6 gli animali immunizzati con emulsione all'1 : 1000, se ne salvarono soltanto 7 su 12 di quelli trattati con emulsioni dall'1 : 10,000 all'1 : 40,000. Peraltro l'influenza della diluizione si avvera solo in dati limiti; invero, mentre morì 1 su 2 e 1 su 4 dei ratti immunizzati con emulsione di virus fisso all'1 : 10,000-20 000, si salvarono entrambi quelli trattati con emulsione all'1 : 40,000. Così pure mentre morì 1 su 3 dei topolini immunizzati con emulsione di cervello di agnello sano all'1 : 10,000 ed all'1 : 20,000 si salvarono tutti e 3 i topolini trattati con la stessa emulsione all'1 : 40,000.

4° Che negli animali trattati e morti di rabbia si ebbero dei ritardi anche di 9 giorni sui controlli.

IV. — Influenza del disseccamento sul potere immunizzante della sostanza nervosa normale e rabica iniettate sottocute.

Sia per decidere l'influenza che esercita il disseccamento sul potere vaccinante della sostanza nervosa, sia per vedere se il disseccamento fosse capace di mettere in evidenza qualche differenza nel potere immunizzante della sostanza nervosa normale e rabida istituii le seguenti esperienze:

I Serie.

a) *Sostanza nervosa normale disseccata di agnello.*

Esperienza I. 19 febbraio 1907. — A due ratti neri infettati di virus di strada sotto cute si fanno due iniezioni al giorno sotto cute per 15 giorni di 1 cmc. per iniezione di emulsione di cervello di agnello sano al 10 % disseccato nel termostato a 30° per 3 giorni, contenente acido fenico all'1 %, iniettando in tutto 30 cmc. di emulsione.

Risultato. — Uno muore dopo 10 e l'altro dopo 12 giorni. Ambedue senza paralisi.

Esperienza di controllo. 19 febbraio 1907. — Due ratti neri vengono infettati di virus di strada sotto cute.

Risultato. — Gli animali presentano paralisi il 3 marzo, ore 8 ant. e muoiono di rabbia lo stesso giorno, ore 8 pom., cioè dopo 12 giorni.

Esperienza III. 16 dicembre 1906. — A due ratti neri infettati di virus di strada sotto cute si fanno due iniezioni al giorno per 11 giorni di 1 cmc. per iniezione di emulsione di cervello di agnello sano all'1 °/₀ disseccato nel termostato a 30° per tre giorni, contenente acido fenico al ½ %, iniettando in tutto 22 cmc. di emulsione.

Risultato. — Gli animali presentano paralisi il 26 dicembre e muoiono il 27 dicembre.

b) *Sostanza nervosa rabica disseccata di coniglio.*

Esperienza I. 16 dicembre 1906. — A due ratti neri infettati di virus di strada sotto cute si fanno due iniezioni al giorno per 15 giorni di 1 cmc. per iniezione di emulsione all'1 °/₀ di virus fisso disseccato nel termostato a 30° per tre giorni, contenente acido fenico al ½ %, iniettando in tutto 30 cmc. di emulsione.

Risultato. — Uno presenta paralisi il 1° gennaio e muore il 2 gennaio. L'altro sopravvive. Viveva ancora il 28 marzo.

Esperienza III. 19 febbraio 1907. — A due ratti neri infettati di virus di stsada sotto cute si fanno due iniezioni al giorno per 15 giorni di 1 cmc. per iniezione di emulsione al 10 % di virus fisso disseccato nel termostato a 30° per tre giorni, contenente acido fenico all'1 %, iniettando in tutto 30 cmc. di emulsione.

Risultato. — Uno muore dopo 10 giorni senza paralisi; e l'altro sopravvive.

II Serie.

a) *Sostanza nervosa normale di agnello disseccata.*

Esperienza. 1° aprile 1907. — Ad otto topolini albini infettati di virus di strada sotto cute, si fanno due iniezioni al giorno per 15 giorni di ¼ di cmc. di un'emulsione fenicata all'1 % di encefalo di agnello sano (10 %)

disseccato sulla soda caustica per tre giorni alla temperatura di 16 gradi (metodo Pasteur), iniettando in tutto cmc. 7 ½ di emulsione (10 grammi di sostanza secca in 100 cmc. di soluzione fenica all'1 %).

Risultato. — Tre topolini presentano paralisi il 13 aprile alle 7 ant. e muoiono il 13 aprile alle 5 pom.; altri tre presentano paralisi il 14 aprile alle 8 ant. e muoiono il 15 aprile alle 9 ant.; un altro presenta paralisi il 14 aprile alle ore 8 ant. e muore il 14 aprile alle ore 3 pom.; un altro fu trovato morto il 14 aprile.

Esperienza di controllo. — Tre topolini albini vengono infettati sotto cute con lo stesso virus di strada.

Risultato. — Due topolini presentano paralisi il 13 aprile e muoiono il 14 aprile; il terzo presenta paralisi il 14 aprile e muore il 15 aprile.

b) *Sostanza nervosa rabbica di coniglio disseccata.*

Esperienza. 29 aprile 1907. — Ad otto topolini albini infettati di virus strada sotto cute, si fanno due iniezioni al giorno per 15 giorni di ¼ di cmc. di un'emulsione fenicata (1 %) di encefalo di coniglio rabbico (virus fisso) disseccato sulla soda caustica per tre giorni alla temperatura di 16 gradi (metodo Pasteur), iniettando in tutto cmc. 7 ½ di emulsione (10 grammi di sostanza secca in 100 cmc. di soluzione fenica all' 1 %.

Risultato. — Uno dei topolini muore per causa ignota dopo tre giorni, un altro presenta paralisi il 14 maggio alle 8 ½ pom. e muore il 15 alle 8 ant. Un altro presenta paralisi il 17 maggio alle 7 ant. e muore il 18 maggio alle 7 pom.; gli altri quattro sopravvivono.

Esperienza di controllo. — Due topolini albini s'infettano sotto cute con un'emulsione di virus di strada.

Risultato. — Entrambi presentano paralisi l'11 maggio alle 5 pom. e muoiono il 13 maggio alle 7 ant.

III Serie.

a) *Sostanza nervosa normale di agnello disseccata.*

Esperienza. 1° aprile 1907. — A quattro ratti neri infettati di virus di strada sotto cute, si fanno due iniezioni al giorno per 15 giorni di 1 cmc. di un'emulsione fenicata 1 % di encefalo di agnello sano disseccato sulla soda caustica per tre giorni (temperatura 16 gradi, metodo Pasteur), iniettando in tutto 30 cmc. di emulsione, 10 grammi di sostanza secca in 100 cmc. di soluzione fenica all'1 %.

Risultato. — Uno dei ratti presenta paralisi il 13 aprile alle ore 4 pomeridiane, un altro presenta paralisi il 14 aprile alle ore 8 ant. e muore il 14 aprile alle ore 4 pom.; gli altri due presentano paralisi il 27 aprile alle ore 8 ant. e muoiono lo stesso giorno alle ore 7 pom. presentando un ritardo sugli altri di 14 giorni.

b) *Sostanza nervosa rabbica di coniglio disseccata.*

Esperienza. 1° aprile 1907. — A cinque ratti neri infettati di virus di strada sotto cute, si fanno due iniezioni al giorno per 15 giorni di 1 cmc. di una emulsione fenicata (1 °/₀) di encefalo di coniglio rabbico (virus fisso), disseccato sulla soda caustica per tre giorni (temperatura 16 gradi, metodo Pasteur), iniettando in tutto 30 cmc. di emulsione. 10 grammi di sostanza secca in 100 cmc. di soluzione fenica all' 1 °/₀.

Risultato. — Uno dei ratti muore l'11 aprile (dopo 10 giorni) per causa ignota; un secondo muore pure per causa ignota il 1° maggio; un terzo presenta paralisi il 19 aprile alle ore 8 ant. e muore lo stesso giorno alle ore 8 pom.: gli altri due sopravvivono: vivevano ancora il 7 giugno,

Esperienza. 19 aprile 1907. — A tre ratti neri infettati di virus di strada sotto cute, si fanno due iniezioni al giorno per 15 giorni di 1 cmc. di una emulsione fenicata (1 °/₀) di encefalo di coniglio rabbico (virus fisso), disseccato a 30 gradi per tre giorni sulla soda caustica, iniettando in tutto 30 cmc. di emulsione, 10 grammi di sostanza secca in 100 cmc. di soluzione fenica all' 1 °/₀.

Risultato. — Uno dei ratti muore il 24 aprile, dopo 5 giorni, per causa ignota; un altro presenta paralisi il 3 maggio alle ore 7 pom. e muore il 4 maggio a ore 8 ant.; il terzo sopravvive.

IV Serie.

a) *Sostanza nervosa normale di cane disseccata.*

Esperienza. 6 maggio 1907. — A sei ratti albini infettati di virus di strada sotto cute, si fanno due iniezioni al giorno per 15 giorni di 1 cmc. di una emulsione fenicata 1 °/₀ di encefalo di cane sano 5 °/₀ disseccato sulla soda caustica per tre giorni (temperatura 18 gradi, metodo Pasteur), iniettando in tutto 30 cmc. di emulsione.

Risultato. — Uno degli animali muore per causa ignota il 17 maggio, vale a dire dopo 11 giorni; altri due presentano paralisi il 19 maggio alle ore 7 ant. e muoiono il 19 maggio alle ore 12 ant.: un quarto presenta paralisi il 23 maggio alle ore 7 ½ pom. e muore il 24 maggio alle ore 7 pom. Gli altri due soppravvivono. Quindi se ne sarebbero salvati 2 su 5.

b) *Sostanza nervosa normale di coniglio disseccata.*

Esperienza. 7 maggio 1907. — A sette ratti albini infettati di virus di strada sotto cute, si fanno due iniezioni al giorno per 15 giorni di 1 cmc. di un'emulsione fenicata 1 °/₀ di encefalo fresco di coniglio sano 5 °/₀ iniettando in tutto 30 cmc. di emulsione.

Risultato. — Uno dei ratti morì per causa ignota il 15 maggio, cioè dopo 10 giorni; un altro presentò paralisi incerta il 19 maggio ore 8 ant., e fu trovato morto il 19 maggio ore 8 pom., un terzo presentò paralisi il

21 maggio alle 8 ½ pom. e morì il 22 maggio alle 7 ant.; gli altri quattro sopravvissero, vivevano ancora l'8 giugno. Quindi si sarebbero salvati 4 ratti su 6, perchè uno morì di causa ignota.

b) *Sostanza nervosa rabica di coniglio disseccata.*

Esperienza. 6 maggio. — A 5 ratti albini infettati di virus di strada sotto cute si fanno due iniezioni al giorno per 15 giorni di 1 cmc. di una emulsione fenicata 1 % di encefalo di coniglio rabbico 5 % disseccato sulla soda caustica per tre giorni (temp. 18 gradi metodo Pasteur) iniettando in tutto 30 cmc. di emulsione.

Risultato. — Uno dei ratti morì il 23 maggio, ore 7 ant., ma non si sa se di rabbia, gli altri 4 sopravvivono, vivevano ancora l'8 giugno.

Quindi si sono salvati 4 su 5.

Esperienza. 6 maggio. — A 5 ratti albini infettati di virus di strada sotto cute si fanno due iniezioni al giorno per 15 giorni di 1 cmc. di un'emulsione fenicata 1 % di encefalo fresco di coniglio rabbico 5 %.

Risultato. — Gli animali sopravvivono tutti, vivevano ancora l'8 giugno.

Esperienza di controllo. 5 maggio 1907. — Due ratti albini vengono infettati di virus di strada sotto cute.

Risultato. — Uno degli animali presenta paralisi il 17 maggio ore 7 antimeridiane, e muore il 17 maggio ore 4 pom., era affetto da vera rabbia furiosa, mordeva ed aggrediva; l'altro presenta pure paralisi il 17 maggio ore 7 ant. e muore il 18 maggio ore 7 ant.

V Serie.

La differenza tra il potere immunizzante della sostanza nervosa normale e rabica da me messa inaspettatamente in evidenza mediante il disseccamento mi sorprese non poco e credetti non inutile istituire una quinta serie di esperienze con sostanza nervosa normale, non soltanto di agnello, ma anche di coniglio, allo scopo di usare la sostanza nervosa della stessa specie di animale al quale apparteneva la rabica.

a) *Sostanza nervosa normale di coniglio disseccata.*

Esperienza. 25 maggio 1907. — A quattro ratti bianchi e uno nero infettati di virus di strada sotto cute si fanno due iniezioni al giorno per 15 giorni di 2 cmc. di una emulsione fenicata 1 % di encefalo di coniglio sano 5 %, disseccata sulla soda caustica per 3 giorni (temp. 18°, metodo Pasteur), iniettando in tutto 30 cmc. di emulsione.

Risultato. — Uno degli animali presenta paralisi il 13 giugno ore 9 pomeridiane e muore il 17 giugno ore 7 ant. e gli altri sopravvivono.

b) *Sostanza nervosa normale di agnello disseccata.*

Esperienza. 25 maggio 1907. — A cinque ratti albini infettati di virus di strada sotto cute si fanno due iniezioni al giorno per 15 giorni di 1 cmc. di un'emulsione fenicata 1 % di encefalo di agnello sano 5 %, disseccato sulla soda caustica per 3 giorni (temp. 18° metodo Pasteur), iniettando in tutto 30 cmc. di emulsione.

***Risultato.* — Uno dei ratti presentò paralisi il 13 giugno, ore 9 pom. e morì il 14 giugno ore 12, un altro morì improvvisamente dopo un mese e gli altri sopravvivono.**

Da questa quinta serie di esperienze risulta:

1° Che i ratti infettati di virus di strada sotto cute ed immunizzati seguendo il metodo usato precedentemente con emulsione di encefalo disseccato di coniglio sano, se ne salvarono 4 : 5;

2° Che di 5 ratti infettati parimenti di virus di strada e trattati con una emulsione di encefalo disseccato di agnello sano, se ne salvarono 3, ma uno dei due morti però perì per causa ignota soltanto dopo 1 mese;

3° Quindi in questa 5ª serie di esperienze anche la sostanza nervosa normale *disseccata* di coniglio e di agnello avrebbe salvati gli animali nella proporzione circa dell'86 % od anche dell'80 % qualora si voglia considerare come morto di rabbia l'animale che fu trovato morto dopo un mese per causa ignota.

Rimane quindi confermato che il disseccamento diminuisce il potere immunizzante della sostanza nervosa.

Conclusione. — 1° Nelle prime esperienze istituite su 64 animali si ebbe che attenuando il potere immunizzante delle due sostanze nervose mercè un leggero disseccamento (3 giorni sulla potassa a 18°) si sarebbe dimostrata una spiccata differenza tra le medesime e precisamente con una marcata superiorità della sostanza nervosa rabbica sulla normale: difatti, mentre su 25 muridi infettati di virus di strada e trattati con sostanza nervosa normale disseccata (encefalo di agnello e di cane) se ne salvarono 2, vale a dire circa il 10 %, su 26 trattati con sostanza nervosa rabbica (coniglio) disseccata, se ne salvarono 18, vale a dire circa il 70 %.

In altre esperienze peraltro, istituite su 40 muridi si ebbe invece che la sostanza nervosa normale salvò gli animali nella proporzione dell' 80 %, mentre la sostanza nervosa rabbica li salvò nella proporzione del 70 %. In queste altre esperienze quindi la sostanza nervosa rabica non avrebbe dimostrata alcuna superiorità sulla normale.

Riunendo poi i risultati delle prime e delle seconde esperienze,

risulterebbe che la sostanza nervosa normale salvò il 45 % degli animali e la sostanza rabica ne salvò il 70 %.

2° che il disseccamento diminuisce anche molto il potere immunizzante della sostanza nervosa rabbica: difatti, mentre la medesima allo stato fresco (mio vaccino) salvò il 100 % degli animali, disseccata invece sulla potassa per soli 3 giorni a 18° circa, ne salvò come si disse soltanto il 70 %.

Quindi il disseccamento nella preparazione del vaccino antirabbico è assolutamente da abolire sostituendo il vaccino Pasteur, con un vaccino preparato con virus fisso, sterilizzato mediante un adatto antisettico (acido fenico 0,5 e 1 %).

Secondo l'esperienze da me istituite, sino ad ora risulta che il potere immunizzante contro la rabbia nei muridi, della sostanza nervosa normale fresca di agnello, non sarebbe inferiore al vaccino Pasteur, preparato con sostanza nervosa rabica di coniglio disseccata.

V. — Confronto del potere immunizzante dell'emulsione fenicata di encefalo fresco di agnello sano 5 % col vaccino Pasteur.

Dopo aver confrontato la sostanza nervosa rabica fresca con la normale pure fresca e dopo aver confrontate le due sostanze allo stato secco, volli confrontare proprio il vaccino Pasteur con la sostanza nervosa normale fresca (di agnello), per decidere se questa fosse più o meno attiva del vaccino francese.

Già da precedenti esperienze (1) istituite su 36 muridi sull'immunizzazione mediante il virus Pasteur contro l'infezione preventiva sottocutanea di virus di strada risultò: 1° Gli animali, in numero di 16, iniettati con 20 sino a 45 cmc. di vaccino, morirono tutti di rabbia. Si salvarono soltanto 4 ratti neri vaccinati con 30 cmc. di virus fisso di 3ª e 4ª giornata; 2° Vaccinando invece gli animali con 60-80 cmc. di vaccino questi, in numero di 20, sopravvissero tutti, cioè il 100 %.

Da queste mie vecchie esperienze quindi risulterebbe essere molto probabile che il vaccino Pasteur non dimostri, almeno sui muridi, un potere immunizzante superiore alla sostanza nervosa normale fresca.

Le nuove esperienze istituite in proposito furono le seguenti:

---

(1) C. Fermi. *Studio sull'immunizzazione contro la rabbia*. Giornale della R. S. Italiana d'igiene, 1906.

a) *Sostanza nervosa normale di agnello fresca.*

Esperienza I. 22 maggio 1907. — A 5 ratti albini infettati di virus di strada sotto cute si fanno due iniezioni al giorno di 1 cmc. per 15 giorni di emulsione fenicata 1 % di encefalo fresco di agnello sano 5 %, iniettando in tutto 30 cmc. di emulsione.

Risultato. — Uno degli animali fu trovato morto dopo un mese, cioè il 22 giugno e gli altri sopravvivono.

Esperienza II. 1° luglio 1907. — A 10 ratti bianchi infettati sotto cute di virus di strada si fanno subito due iniezioni al giorno di 1 cmc. l'una per 15 giorni, iniettando così 30 cmc. di cervello fresco di agnello sano.

Risultato. — Gli animali sopravvivono tutti meno 2 che presentano paralisi l'uno il 18 luglio alle 4 pomeridiane, l'altro il 19 luglio alle 7 antimeridiane e muoiono rispettivamente il 19 luglio alle 7 pomeridiane e il 20 luglio alle 7 antimeridiane

1ª Esperienza di controllo. 1 luglio 1907. — Tre ratti bianchi vengono infettati di virus di strada sotto cute.

Risultato. — Gli animali restano paralizzati il 15 luglio alle 4 pomeridiane e muoiono tutti il 18 luglio alle 7 antimeridiane.

2ª Esperienza di controllo. 22 maggio 1907. — Un ratto bianco viene infettato di virus di strada sotto cute

Risultato. — L'animale presenta paralisi il 5 giugno ore 9 antimeridiane e muore il 6 giugno ore 10 antimeridiane.

3ª Esperienza di controllo. 25 maggio 1907. — Un ratto bianco viene infettato di virus di strada sotto cute.

Risultato. — L'animale presenta paralisi il 13 giugno ore 9 pomeridiane e muore il 16 giugno ore 7 antimeridiane.

b) *Vaccino Pasteur.*

Esperienza. 1° luglio 1907. — A 10 ratti bianchi infettati sotto cute di virus di strada si fanno subito 2 iniezioni al giorno di 1 cmc. per 15 giorni, iniettando in tutto 30 cmc. di vaccino Pasteur dal M. 10 al M. 1 (10-9-8 7-6-6-5-5-4-4-6-6-5-5-4 4-3-3-3-3-3-3-6-6-6-5-5 2-2-2-1-1).

Risultato. — Uno dei ratti resta paralizzato il 16 luglio alle 4 pomeridiane e muore il 18 luglio alle 7 antimeridiane. Altri 2 presentano paralisi uno il 17 luglio alle 7 antimeridiane, l'altro il 16 luglio alle 7 antimeridiane e muoiono entrambi il 19 luglio alle 5 pomeridiane. Gli altri sopravvivono.

Conclusione. — Da queste esperienze risulta:

1° Che di 15 ratti, infettati di virus di strada ed immunizzati con encefalo fresco di agnello sano, se ne salvarono 12. Dei tre morti

due perirono bensì di rabbia, ma il terzo morì soltanto dopo un mese per causa ignota. Se ne salvarono quindi l' 86.6 %;

2° Che il vaccino Pasteur salvò 7 : 10 dei ratti infettati sotto cute di virus di strada, cioè il 70 %;

3° Che l'emulsione fenicata di encefalo normale fresco di agnello è superiore al vaccino Pasteur.

Difatti, mentre coll'emulsione di sostanza nervosa normale fresca si salvarono 13 : 15, non contando il ratto morto per causa ignota, degli animali infettati sotto cute di virus di strada, cioè l' 86.6 % e perirono tutti i controlli, col vaccino Pasteur invece se ne salvarono soltanto il 70 %.

Anzi, come s'è visto nel capitolo primo, la sostanza normale fresca (di agnello) salvò il 100 % degli animali, usandola in un'emulsione al 10 %.

VI. — Influenza del riscaldamento a 100°, 98°, 75° sul potere vaccinante della sostanza nervosa normale e rabbica.

Pure di non poca importanza mi parve il decidere se il potere immunizzante della sostanza nervosa normale e rabbica resistesse o no all'ebollizione.

Le seguenti esperienze ebbero lo scopo di rispondere a questa domanda.

a) *Sostanza nervosa normale riscaldata a 100° C. per 30'.*

Esperienza. 15 febbraio 1907. — A 5 topolini albini infettati di virus di strada, si fanno 2 iniezioni al giorno per 15 giorni di $^1/_4$ di cmc. per iniezione di emulsione di cervello di agnello sano al 5 % riscaldata a 100° per 30', contenente acido fenico al ½ %, iniettando in tutto 7 ½ cmc. di emulsione.

Risultato. — 4 topolini presentano paralisi il 6 marzo ore 9 ant. e muoiono lo stesso giorno alle ore 2 pom. L'altro presenta paralisi il 9 marzo ore 8 ant. e muore lo stesso giorno alle ore 3 pom. Quattro di questi animali presentarono un ritardo di un giorno e l'altro di 4 giorni sui controlli.

La sostanza nervosa normale riscaldata a 100 gradi per 30 minuti perde il suo potere vaccinale.

Esperienza. 1 ottobre 1907. — A 6 ratti bianchi infettati di virus di strada sotto cute, si fanno due iniezioni al giorno per 15 giorni di 1 cmc. di un'emulsione fenicata (1 %) di encefalo di agnello sano (10 %) sottoposto alla temperatura di 100 gradi per 30 minuti, iniettando in tutto 30 cmc. di emulsione.

Risultato. — Tre ratti presentano paralisi il 15 aprile ore 8 ant. e muoiono il 16 aprile alle 5 pom.; gli altri tre presentano paralisi il 17 aprile alle 9 ant. e muoiono il 18 aprile alle ore 5 pom., due di questi animali presentano un ritardo di due giorni sui controlli,

ESPERIENZA DI CONTROLLO. 1 aprile 1907. — Quattro ratti bianchi vengono infettati di virus di strada sotto cute.

Risultato. — Uno presenta paralisi il 13 aprile ore 7 ant. e muore il 14 aprile ore 7 ant.; un altro presenta paralisi il 14 aprile ore 11 ant. e muore il 15 aprile ore 4 ant.; un terzo presenta paralisi il 15 aprile ore 9 ant. e muore il 16 aprile ore 8 ant., il quarto muore il 13 aprile senza paralisi.

b) *Sostanza nervosa rabbica riscaldata a 100° per 30′*

ESPERIENZA. 15 febbraio 1907. — A 5 topolini albini infettati di virus di strada si fanno due iniezioni al giorno sotto cute per 15 giorni di $^1/_4$ di cmc. per iniezione di emulsione di virus fisso 5 % riscaldata a 100° per 30′, contenente acido fenico al ½ %, iniettando in tutto 7 $^1/_2$ cmc. di emulsione.

Risultato. — Tre topolini presentano paralisi il 6 marzo mattina e muoiono il 7 marzo ore 8 ant, gli altri 2 presentano paralisi l'8 marzo e muoiono lo stesso giorno.

Quindi anche la sostanza nervosa rabica, come la normale, col riscaldamento a 100° per 30′ ha perduto il suo potere immunizzante.

ESPERIENZA DI CONTROLLO. 15 febbraio 1907. — 2 topolini albini vengono infettati di virus di strada sotto cute.

Risultato. — Presentano paralisi il 5 marzo ore 8 ant, e muoiono lo stesso giorno alle ore 6 pom.

a) *Sostanza nervosa normale riscaldata a 98° per 30′.*

ESPERIENZA. 21 aprile 1907. — A tre topolini albini infettati di virus di strada sotto cute si fanno due iniezioni di $^1/_4$ di cmc. di un'emulsione fenicata (1 %) di encefalo di agnello sano al 10 % riscaldata a 98 gradi per 15 minuti. Iniettando in tutto 7 ½ cmc. di emulsione.

Risultato. — Uno dei topolini muore il 4 maggio, cioè dopo 14 giorni per causa ignota; un altro muore il 16 maggio, cioè dopo 16 giorni pure per causa ignota ed il terzo presenta paralisi il 7 maggio alle 12 antimeridiane e muore il 7 maggio alle 4 pom. Uno dei tre topolini presenta un ritardo di due ed un altro di tre giorni sui controlli. Quindi la sostanza nervosa normale a 98 gradi per 30 minuti avrebbe perduto il suo potere immunizzante.

b) *Sostanza nervosa rabica riscaldata a 98° per 30′.*

ESPERIENZA. 21 aprile 1907. — A tre topolini albini infettati di virus di strada sotto cute si fanno due iniezioni al giorno per 15 giorni di $^1/_4$ di cmc. di un'emulsione fenicata (1:100) di encefalo di coniglio rabbico

(virus fisso) al 10 °/₀ riscaldata a 98 gradi per 15 minuti. Iniettando in tutto 7 ½ cmc. di emulsione.

Risultato. — Uno dei topolini presenta paralisi il 7 maggio alle 7 ant. e muore il 7 maggio alle 8 pom.; un altro presenta paralisi il 6 maggio alle 7 ant. e muore il 7 maggio alle 7 ant. Il terzo sopravvive.

Due animali morirono con un ritardo di 2 o 3 giorni sui controlli. Quindi la sostanza nervosa rabbica riscaldata a 98 gradi per 30 minuti avrebbe perduto il suo potere immunizzante.

a) *Sostanza nervosa normale riscaldata a 75° per 15'.*

Esperienza. 21 aprile 1907. — A tre topolini albini infettati di virus di strada sotto-cute si fanno due iniezioni al giorno per 15 giorni di ¹/₄ di cmc. di un'emulsione fenicata (1: 100) di encefalo di agnello sano al 10 °/₀ riscaldata a 75 gradi per 15 minuti. Iniettando in tutto 7 ½ cmc. di emulsione.

Risultato. — Uno dei topolini muore dopo due giorni per causa ignota e gli altri due presentano paralisi il 6 maggio alle 8 ant. e muoiono di rabbia il 7 maggio alle 7 ant.

Due dei tre animali sono morti con un ritardo di 2 giorni sui controlli.

La sostanza nervosa normale perde anche a 75 gradi il suo potere immunizzante.

a) *Sostanza nervosa rabica riscaldata a 75° per 15'.*

Esperienza. 21 aprile 1907. — A tre topolini albini infettati di virus di strada sotto-cute si fanno due iniezioni al giorno per 15 giorni di ¹/₄ di cmc. di un'emulsione fenicata (1: 100) di encefalo di coniglio rabbico (virus fisso) al 10 °/₀ riscaldata a 75 gradi per 15 minuti. Iniettando in tutto 7 ½ cmc. di emulsione.

Risultato. — Uno dei topolini presenta paralisi il 4 maggio alle 7 pom. e muore il 5 maggio alle 7 ant., un altro presenta paralisi il 10 maggio alle 7 ant. e muore il 10 maggio alle 9 pom., un altro muore il 6 maggio alle 7 ant. probabilmente di rabbia.

Uno degli animali muore con un ritardo di 5 giorni sui controlli.

La sostanza nervosa a 75 gradi avrebbe perduto il potere immunizzante.

Esperienza di controllo. 21 aprile 1907. — A due topolini albini si inietta ¹/₄ di cmc. di un'emulsione di virus di strada sotto cute.

Risultato. — I due topolini presentano paralisi il 4 maggio alle 7 pom. e muoiono il 5 maggio alle 7 ant.

Conclusione. — Da queste esperienze risulta quindi: che la sostanza nervosa normale e la rabbica sottoposte alla temperatura di 100° e 98° per 30 minuti od anche solo a 75° per 15 minuti perdono completamente il loro potere immunizzante contro l'infezione

rabbica: difatti di 28 muridi infettati di virus di strada sotto cute e poscia trattati con due iniezioni al giorno per 12 o 15 giorni di una emulsione di sostanza nervosa sia normale che rabbica sottoposta alle temperature suddette morirono tutti, insieme ai controlli ad eccezione di uno, presentando solo un ritardo di qualche giorno su di essi.

La sostanza immunizzante contenuta nella sostanza nervosa normale e nel vaccino antirabbico è quindi alterabile non solo a 100° ma anche a 75°.

VII. — Potere immunizzante della sostanza nervosa normale e rabica sottoposte all'azione del succo gastrico naturale ed artificiale.

Un'altra via per mettere in evidenza qualche differenza nel potere immunizzante della sostanza nervosa normale e quello della sostanza nervosa rabica era quella di sottoporre le due sostanze anche all'azione di qualche agente chimico. Tra questi agenti scelsi il succo gastrico allo scopo di confrontare il così detto metodo italiano di vaccinazione col vaccino Pasteur e col mio.

Le esperienze vennero condotte nel seguente modo: 10 gr. di sostanza nervosa venivano emulsionati in 100 cmc. di succo gastrico di cane (1), oppure in succo gastrico artificiale (pepsina Grübler 3 °/₀₀, HCl 2 °/₀₀). Le prove si posero per 3 ore a 37°, si neutralizzarono poscia con carbonato sodico e si diluirono con altri 100 cmc. di acido fenico 1 %, così da avere una emulsione di sostanza nervosa al 5 %.

I. — Succo gastrico naturale.

a) *Sostanza nervosa normale di agnello.*

Esperienza. 27 giugno 1907. — A 5 ratti neri infettati di virus di strada sotto cute si fanno subito 2 iniezioni al giorno per 15 giorni di un'emulsione di encefalo di agnello sano 5 % trattata con succo gastrico naturale di cane.

Risultato. — Gli animali sopravvivono tutti.

Esperienza di controllo. 27 giugno 1907. — Tre ratti neri vengono infettati di virus di strada sotto cute.

Risultato. Due degli animali presentano paralisi il 10 luglio alle 7 ant. e muoiono l'11 luglio alle 4 pom. Il terzo presenta pure paralisi il 10 luglio alle 7 ant. e muore l'11 luglio alle ore 11 ant.

---

(1) Ringrazio il prof. Coronedi che cortesemente mi fornì il succo gastrico naturale per queste esperienze.

b) *Sostanza nervosa rabica di coniglio.*

Esperienza. 27 giugno 1907. — A 5 ratti neri infettati di virus di strada sotto cute si fanno subito 2 iniezioni al giorno per 15 giorni di un'emulsione di encefalo di coniglio rabico 5 % trattato con succo gastrico naturale.

Risultato. — Uno dagli animali fu trovato morto per causa ignota il 9 luglio alle 7 ant., vale a dire dopo 13 giorni. Un'altro fu pure trovato morto il 10 luglio alle 7 ant., vale a dire dopo 14 giorni; un terzo presentò paralisi il 17 luglio alle 5 pom, e morì il 18 luglio. Gli altri due sopravvivono.

II. — Succo gastrico artificiale.

a) *Sostanza nervosa normale.*

Esperienza. 27 giugno 1907. — A 5 ratti neri infettati di virus fisso sotto cute si fanno subito 2 iniezioni al giorno per 15 giorni di un'emulsione di encefalo di agnello sano 5 % trattata con succo gastrico artificiale.

Risultato. — Uno degli animali presenta paralisi il 13 luglio alle 4 $^1/_2$ pom. e muore il 15 luglio alle 7 ant. Gli altri 4 sopravvivono.

b) *Sostanza nervosa rabica.*

Esperienza. 27 giugno 1907. — A 5 ratti neri infetti di virus di strada sotto cute si fanno subito 2 iniezioni al giorno per 15 di un'emulsione di encefalo di coniglio rabido 5 % trattata con succo gastrico artificiale.

Risultato. — Uno degli animali presenta paralisi il 10 luglio alle 7 ant. e muore l'11 luglio alle 10 ant. Gli altri 4 sopravvivono.

Conclusione. — Da queste esperienze risulta quanto segue:

1° Che non si è trovata nessuna differenza tra il potere immunizzante contro l'infezione sottocutanea di virus di strada tra la sostanza nervosa normale di agnello e la rabica di coniglio (virus fisso) trattate con succo gastrico, sia naturale che artificiale. Anzi nelle prime esperienze con succo gastrico naturale mentre si salvarono tutti gli animali trattati con sostanza nervosa normale, se ne salvarono soltanto due di quelli trattati con sostanza nervosa rabica. Dei tre animali morti, uno perì di rabbia e gli altri due dopo 13-14 giorni senza paralisi.

Nelle seconde esperienze poi con succo gastrico artificiale le due sostanze nervose si comportarono in modo identico, inquantochè in entrambi i casi si salvarono 4 : 5 degli animali, vale a dire l'80 %;

2° E' fuori di dubbio che il succo gastrico diminuisce alquanto

il potere vaccinante tanto della sostanza nervosa normale che della rabica e che il metodo italiano mentre non è superiore al metodo Pasteur, è inferiore senz'altro al mio.

VIII. — Potere immunizzante della sostanza nervosa normale e rabbica somministrata per ingestione.

Una volta che avevo dimostrato il potere immunizzante contro la rabbia della sostanza nervosa rabida somministrata per bocca, ritenni di capitale importanza il decidere se la stessa azione fosse propria anche della sostanza nervosa normale.

Se anche ciò si fosse avverato, avrei dimostrato nel modo più decisivo, che il totale potere immunizzante del vaccino Pasteur è da ascrivere quasi completamente alla sostanza nervosa normale.

a) *Sostanza nervosa normale di agnello.*

Esperienza I. 29 novembre 1906. — 5 topolini albini vengono nutriti per 30 giorni con grano impastato col cervello d'agnello sano, in modo che ad ogni topolino tocca 1 gr. di cervello al giorno. Avanti il 30° giorno 3 dei topolini muoiono per causa ignota.

Il 29 dicembre, cioè il 30° giorno del trattamento i 2 topolini rimasti vengono infettati di virus di strada sotto cute insieme a 2 topolini di controllo.

Risultato. — I due topolini immunizzati per ingestione di sostanza nervosa normale sopravvivono, mentre i 2 topolini di controllo presentano paralisi il 9 gennaio 1907 e muoiono di rabbia il 10 gennaio, cioè dopo 12 giorni.

Uno dei 2 topolini immunizzati e sopravvissuti viene infettato il 25 gennaio 1907 di virus fisso. L'animale sopravvive.

Esperienza II. 10 gennaio 1907. — 20 topolini albini vengono nutriti per 30 giorni con grano, impastato col cervello d'agnello sano, in modo che ad ogni topolino toccano 3 gr. di cervello al giorno.

Il 10 febbraio, cioè dopo 30 giorni tutti i 20 topolini vengono infettati di virus di strada sotto cute insieme ad altri 5 di controllo.

Risultato. — I 20 topolini immunizzati mediante ingestione di cervello sano sopravvivono tutti mentre i 5 controlli presentano paralisi tra il 20 e il 21 febbraio e muoiono di rabbia il 22-23 febbraio, vale a dire dopo 12-13 giorni.

b) *Sostanza nervosa rabbica.*

Esperienza I. 4 novembre 1906. — Cinque topolini albini vengono nutriti per 30 giorni con grano impastato coll'encefalo di coniglio rabido (virus fisso), in modo che ad ogni topolino toccano 2 gr. di sostanza

nervosa per giorno. Il 4 dicembre, cioè al termine dei 30 giorni, vengono infettati sotto cute di virus di strada.

Risultato. — Gli animali sopravvivono.

Dopo 20 giorni si infettano di nuovo sotto cute, ma con virus fisso. Gli animali sopravvivono ugualmente.

Allora dopo altri 15 giorni si inoculano di nuovo di virus fisso. Gli animali sopravvivono tutti anche a questa terza infezione e vivevano ancora il 27 marzo 1907.

Esperienza II. 4 novembre 1906. — Sette topolini albini vengono nutriti per 30 giorni con grano impastato coll'encefalo di coniglio rabido (virus fisso) in modo che ad ogni topolino toccano 2 gr. di sostanza nervosa per giorno. Il 4 dicembre, cioè al termine dei 30 giorni, vengono infettati sotto cute di virus di strada.

Risultato. — Gli animali sopravvivono.

Il 24 dicembre si inoculano tutti quanti di virus fisso sotto cute. Gli animali sopravvivono ugualmente.

Il 30 dicembre si ripete l'infezione di virus fisso. Gli animali sopravvivono ancora.

Il 25 gennaio 1907 si ripete per la terza volta l'infezione di virus fisso. Gli animali sopravvivono. Vivevano ancora il 27 marzo.

Conclusione. — Da queste 2 serie di esperienze risulta quindi:

Che la sostanza nervosa, non soltanto rabbica, ma anche normale, somministrata per ingestione, è capace di immunizzare sicuramente i topolini contro una susseguente infezione sottocutanea di virus di strada o di virus fisso: difatti 9 topolini ai quali venne somministrato per bocca nel periodo di 30 giorni circa 60 gr. di sostanza nervosa e poscia infettati di virus di strada, sopravvissero tutti; resistettero pure ad altre infezioni di virus fisso. Di 24 topolini nutriti nello stesso modo, ma con sostanza nervosa normale, e poscia infettati sottocute parte di virus di strada e parte di virus fisso, sopravvissero pure tutti.

IX. — Potere vaccinante della sostanza nervosa normale e rabbica, trattata con acido cloridrico 3 per mille, somministrata per ingestione.

Credetti di una certa importanza il provare se il potere vaccinante della sostanza nervosa normale o rabbica introdotta per la via orale, resistesse o no all'azione dell'acido cloridrico nella concentrazione massima in cui si trova il succo gastrico.

A questo scopo eseguii le sottostanti ricerche.

a) *Sostanza nervosa normale trattata con HCl 3 °/₀₀.*

ESPERIENZA I. 30 novembre 1906. — Cinque topolini albini vengono nutriti per 30 giorni con grano impastato con un'emulsione di cervello di agnello sano al 50 % trattato con acido cloridrico 3 °/₀₀ per 5 ore e poscia neutralizzato con carbonato di soda. Ad ogni topolino vengono a toccare 3 gr. di cervello di agnello sano. Uno dei topolini muore per causa ignota dopo 13 giorni, e gli altri 4 vengono, il 30 dicembre, vale a dire dopo 30 giorni, infettati di virus di strada sotto cute insieme ad altri 2 di controllo.

Risultato. — I quattro topolini sopravvivono, mentre i due controlli presentano paralisi il 10 gennaio e muoiono lo stesso giorno.

I quattro topolini sopravvissuti vengono infettati il 25 gennaio sotto cute di virus fisso e sopravvivono.

ESPERIENZA II. 7 gennaio 1907. — Venti topolini albini vengono nutriti per 30 giorni con grano impastato con un'emulsione di cervello di agnello sano al 50 % trattato con acido cloridrico 3 °/₀₀ per 5 ore e poscia neutralizzato con carbonato di soda. Ad ogni topolino vengono a toccare 3 gr. di cervello di agnello sano. Il 7 febbraio, cioè dopo 30 giorni, 10 dei 20 topolini vengono infettati sotto cute di virus fisso e gli altri 10 di virus di strada.

Risultato. — Sei dei dieci topolini infettati di virus fisso presentano paralisi tra il 13 ed il 15 febbraio e muoiono tra il 14 ed il 16 febbraio, gli altri 4 sopravvivono; mentre i 10 topolini infettati di virus di strada sopravvivono tutti.

b) *Sostanza nervosa rabbica trattata con HCl 3 °/₀₀.*

ESPERIENZA I. 30 novembre 1906. — Cinque topolini albini vengono nutriti per 30 giorni con grano impastato con un'emulsione di virus fisso al 50 % trattato con acido cloridrico 3 °/₀₀ per 5 ore e poscia neutralizzato con carbonato di soda.

Ad ogni topolino vengono a toccare 3 gr. di virus fisso.

Tre dei topolini muoiono per causa ignota dopo 17 giorni, e gli altri due vengono, il 30 dicembre, vale a dire dopo 30 giorni, infettati di virus di strada sotto cute insieme ad altri 2 di controllo.

Risultato. — I 2 animali immunizzati sopravvivono, mentre gli altri 2 di controllo presentano paralisi il 9 gennaio e muoiono di rabbia il 10 gennaio.

Il 25 gennaio i 2 topolini sopravvissuti vengono infettati di virus fisso sotto cute e sopravvivono; vivevano ancora il 27 marzo.

ESPERIENZA II. 7 gennaio 1907. — Venti topolini albini vengono nutriti per 30 giorni con grano impastato con un'emulsione di virus fisso al 50 % trattato con acido cloridrico 3 °/₀₀ per 5 ore e poscia neutralizzato con carbonato di soda.

Ad ogni topolino vengono a toccare 3 gr. di virus fisso.

Il 7 febbraio, cioè dopo 30 giorni, 10 dei 20 topolini vengono infettati sotto cute di virus fisso e gli altri 10 di virus di strada.

Risultato. — Due dei topolini infettati di virus fisso presentano paralisi il 13 febbraio ore 4 pom. e muoiono il 14 febbraio ore 8 ant.

Altri 2 presentano paralisi il 14 febbraio ore 8 ant. e muoiono il giorno stesso ore 7 pom.

Altri 3 presentano paralisi il 15 febbraio, ore 8 ant., e muoiono di rabbia lo stesso giorno alle 7 pom.

Gli altri 3 topolini sopravvivono.

Tutti i 10 topolini infettati di virus di strada sopravvivono e vivevano ancora il 27 marzo.

Conclusione. — Da queste esperienze se ne conclude quindi:

Che la sostanza nervosa normale e rabbica trattata con acido cloridrico al 3 $^{o}/_{oo}$ e poscia neutralizzata con carbonato sodico, conserva ancora il potere di immunizzare per ingestione i topolini contro una susseguente infezione sottocutanea di virus di strada, ma lo perdette in parte nell'immunizzazione contro l'infezione di virus fisso: infatti mentre di 10 topolini nutriti per 30 giorni con le sostanze suddette e poscia infettati di virus fisso, se ne salvarono soltanto 3, di altri 10 topolini nutriti nello stesso modo, ma infettati di virus di strada, non ne morì nessuno.

Differenze tra la sostanza nervosa normale e rabica non vennero constatate.

X. — Azione immunizzante della sostanza nervosa normale e rabbica introdotte per via rettale.

Analoghe esperienze ho eseguite, introducendo per via rettale la sostanza nervosa, sia normale che rabbica. Delle esperienze istituite sui ratti riassumo soltanto i risultati come segue:

1° Introducendo nel retto dei ratti 10 cmc. al giorno per 11-13 giorni (in tutto 110-130 cmc.) di emulsione di sostanza nervosa normale (encefalo di agnello sano) e poscia infettati di virus strada sotto cute, ne sopravvissero 1 : 4.

2° Praticando due iniezioni endo-rettali al giorno di 10 cmc. ciascuna per 20 giorni ed infettando come sopra (in tutto 200 cmc. di emulsione di virus fisso fresco al 10 %) si salvarono in ragione di 1 : 3.

3° Trattando gli animali come sopra, arrivando però ad introdurre nel retto 300 cmc. di emulsione di virus fisso al 10 %, si salvarono in proporzione di 2 : 3.

4° Praticando lo stesso trattamento su 20 ratti previamente infettati di virus di strada, contrariamente a quanto si fece nelle precedenti esperienze con una emulsione più concentrata e precisamente al 30 %. iniettandone 300 cmc. in 15 giorni, morirono tutti i 10 ratti trattati con sostanza nervosa normale e 7 : 10 di quelli trattati con sostanza nervosa rabica. Le due emulsioni erano state preparate in soluzione fisiologica.

Il numero di queste esperienze è troppo piccolo per poterne trarre delle conclusioni e per poter fare un confronto tra la sostanza normale e la rabbica, tanto più che in tali esperienze con la sostanza nervosa normale si somministrò di questa soltanto la metà e 1/3 della rabbica.

Quello che si può dire è soltanto che la via rettale si è dimostrata di gran lunga inferiore alla via orale rispetto alla efficacia immunizzante della sostanza nervosa.

XI. — Azione immunizzante del siero dei cani trattati con una emulsione fenicata di sostanza nervosa normale e rabbica.

a) *Siero di cani immunizzati con sostanza nervosa normale.*

Anzitutto principiai coll'immunizzazione dei cani, come segue:

Esperienza I. 10 dicembre 1906. — A due cani del peso di kg. 5 e 4.400 si fanno 2 iniezioni al giorno per 25 giorni di 2.5 cmc. di emulsione fenicata di cervello di agnello sano, iniettandone in tutto a ciascuno 125 cmc. Il 2 febbraio 1907 infettati di virus fisso sotto cute, sopravvivono. Il 16 febbraio si uccidono per disanguamento, se ne prepara il siero e si istituiscono col medesimo le seguenti ricerche:

Esperienza II. 20 febbraio 1907. — Si infetta un topolino nero sotto cute mediante iniezione di 1/4 di cmc. di emulsione di virus fisso e poscia si pratica al medesimo un'iniezione al giorno per 3 giorni di 1/4 di cmc. di siero di cane immunizzato per 25 giorni con emulsione di cervello di agnello sano, iniettando in tutto 3/4 di cmc. di siero.
Risultato. — L'animale sopravvive.

Esperienza III. 20 febbraio 1907. — Si infetta un topolino nero come sopra e poscia si praticano al medesimo 2 iniezioni al giorno per 3 giorni di 1/4 di cmc. del suddetto siero, iniettandone in tutto 1 $^1/_2$ cmc.
Risultato. — L'animale sopravvive.

Esperienza IV. 20 febbraio 1907. — Si infettano 2 topolini neri come sopra e poscia si praticano in essi 2 iniezioni al giorno per 5 giorni di 1/4 di cmc. del suddetto siero, iniettandone in tutto 2 $^1/_2$ cmc.
Risultato. — I due topolini sopravvivono.

b) *Siero di cani immunizzati con sostanza nervosa rabbica.*

Principiai anche in questo caso coll'immunizzazione dei cani:

Esperienza I. 6 dicembre 1906. — Ad un cane del peso di kg. 6 si fanno 2 iniezioni al giorno per 15 giorni di 5 cmc. per iniezione, iniettando in tutto 150 cmc. di emulsione fenicata di virus fisso al 10 %. Il 22 dicembre, vale a dire dopo 16 giorni, si uccide l'animale per dissanguamento e se ne prepara il siero.

Esperienza II. 10 dicembre 1906. — Ad un cane del peso di kg. 5.900 si fanno 2 iniezioni al giorno per 25 giorni di 2.5 cmc. per iniezione, iniettando in tutto 125 cmc. di emulsione fenicata di virus fisso al 10 %. Il 14 marzo, vale a dire dopo circa 3 mesi, si uccide l'animale per dissanguamento e se ne prepara il siero.

Esperienza III. 10 dicembre 1906. — Ad un cane del peso di kg. 4.400 si fanno 2 iniezioni al giorno per 25 giorni di 2.5 cmc. per iniezione, iniettando in tutto 125 cmc. di emulsione fenicata di virus fisso al 10 %. Il 14 febbraio si infetta l'animale sotto dura di virus fisso.

L'animale sopravvive. Dopo 20 giorni si uccide per dissanguamento e se ne prepara il siero.

Ciò fatto si procede alle seguenti ricerche:

Esperienza IV. 20 febbraio 1907. — Si infetta un topolino nero sotto cute mediante iniezione di 1/4 di cmc. di emulsione di virus fisso e poscia si pratica al medesimo un'iniezione al giorno per 3 giorni di 1/4 di cmc. di siero di cane immunizzato con emulsione di virus fisso (2 iniezioni al giorno per 25 giorni di cmc. 2.5, in tutto 125 cmc.) iniettando in tutto 3/4 di cmc. di siero.

Risultato. — L'animale sopravvive.

Esperienza V. 20 febbraio 1907. — Si infetta un topolino nero come sopra e poscia si praticano al medesimo 2 iniezioni al giorno per 3 giorni di 1/4 di cmc. del suddetto siero, iniettandone in tutto cmc. 1 ½.

Risultato. — L'animale sopravvive.

Esperienza VI. 20 febbraio 1907. — Si infettano 2 topolini neri come sopra e poscia si praticano ad essi 2 iniezioni al giorno per 5 giorni di 1/4 di cmc. del suddetto siero, iniettandone in tutto cmc. 2 ½.

Risultato. — Gli animali sopravvivono.

Conclusione. — Da queste quattro sorta di esperienze risulta chiaramente:

1° Che il siero di cane immunizzato con emulsione di sostanza nervosa normale è dotato di spiccato potere immunizzante: difatti tutti i topolini infettati sotto cute, col potente virus fisso di Sassari e poscia trattati col suddetto siero nella proporzione da cmc. 0.75 a 2.5, in tre giorni, sopravvissero.

XII. — Azione immunizzante del siero di cani trattati con una emulsione fenicata di sostanza nervosa normale e rabbica iniettato dopo vario tempo dalla praticata infezione di virus fisso.

A questo proposito istituii le seguenti esperienze:

SERIE I.

a) *Siero di cane trattato con sostanza nervosa normale.*

ESPERIENZA I. 16 marzo 1907. — A 2 topolini albini infettati di virus fisso sotto cute, si fanno 2 iniezioni al giorno per 5 giorni di 1/4 di cmc. di siero di cane immunizzato mediante una emulsione di encefalo di agnello sano (2 iniezioni al giorno per 25 giorni di cmc. 2 1/2, iniettando in tutto 125 cmc.). Si principia questo trattamento 24 ore dopo l'infezione.
Risultato. — Uno dei topolini presenta paralisi il 25 marzo ore 8 antimeridiane e muore lo stesso giorno alle ore 7 pomeridiane. L'altro sopravvive.

ESPERIENZA II. 16 marzo 1907. — A due topolini albini infettati di virus fisso sotto cute, si fanno 2 iniezioni al giorno per 4 giorni di 1/4 di cmc. di siero di cane come sopra, iniettandone in tutto 2 cmc. per ciascuno. Si principia questo trattamento 48 ore dopo l'infezione.
Risultato. — Uno dei topolini sopravvive e l'altro presenta paralisi il 25 marzo ore 7 pomeridiane e muore il 26 marzo ore 8 antimeridiane.

ESPERIENZA III. 16 marzo 1907. — A 2 topolini albini infettati di virus fisso sotto cute, si fanno 2 iniezioni al giorno per 3 giorni di 1/4 di cmc. del suddetto siero di cane, iniettandone in tutto cmc. 1 1/2 per ciascuno. Si principia questo trattamento 72 ore dopo l'infezione.
Risultato. — I due topolini muoiono alle 7 pomeridiane del 21 marzo.

b) *Siero di cane trattato con sostanza nervosa rabbica.*

ESPERIENZA I. 16 marzo 1907. — A 2 topolini albini infettati di virus fisso sotto cute si fanno 2 iniezioni al giorno per 5 giorni di 1/4 di cmc. di siero di cane (immunizzato mediante 25 iniezioni di 5 cmc. ciascuna di emulsione fenicata di virus fisso), iniettandone in tutto cmc. 2 1/2 per ciascuno. Si principia questo trattamento 24 ore dopo l'infezione.
Risultato. — Uno degli animali presenta paralisi il 25 marzo ore 4 pomeridiane e muore il 26 marzo ore 8 antimeridiane; l'altro sopravvive.

ESPERIENZA II. 16 marzo 1907. — A 2 topolini albini infettati di virus fisso sotto cute si fanno 2 iniezioni al giorno per 4 giorni di 1/4 di cmc. di siero di cane come sopra, iniettandone in tutto 2 cmc. per ciascuno. Si principia questo trattamento 48 ore dopo l'infezione.
Risultato. — Uno degli animali presenta paralisi il 25 marzo ore 4 pomeridiane e muore il 26 marzo ore 8 antimeridiane; l'altro sopravvive.

Esperienza III. 16 marzo 1907. — A 2 topolini albini infettati di virus fisso sotto cute, si fanno 2 iniezioni al giorno per 3 giorni di 1/4 di cmc. del suddetto siero di cane, iniettandone in tutto cmc. 1 $^1/_2$ per ciascuno. Si principia questo trattamento 72 ore dopo l'infezione.

Risultato. — Gli animali presentano paralisi il 21 marzo ore 9 antimeridiane e muoiono lo stesso giorno alle ore 7 pomeridiane.

Esperienza di controllo. 16 marzo. — Due topolini infettati di virus fisso sotto cute presentano paralisi il 21 marzo mattina e muoiono alle 6 di sera dello stesso giorno.

c) *Siero di cane immunizzato con sostanza nervosa rabbica.*

Esperienza. 12 maggio 1907. — A un ratto bianco infettato di virus fisso sotto cute si fanno, principiando 48 ore dopo l'infezione, due iniezioni di siero di cane immunizzato con un'emulsione di encefalo di coniglio rabbico 5 % (2 iniezioni al giorno per 25 giorni di cmc. 2 $^1/_2$) iniettando in tutto 125 cmc.

Risultato. — L'animale presenta paralisi il 20 maggio ore 7 antimeridiane e poi guarisce.

Esperienza. 12 maggio 1907. — S'infetta un ratto bianco sotto cute di un'emulsione di virus fisso e poscia, principiando 72 ore dopo l'infezione, si fanno 2 iniezioni al giorno per 3 giorni di 1 cmc di siero di cane immunizzato con un'emulsione di encefalo di coniglio rabbico 5 $^0/_0$ (2 iniezioni al giorno per 25 giorni di 2 $^1/_2$ cmc), iniettando in tutto 125 cmc.

Risultato. — L'animale presenta paralisi il 18 maggio ore 7 antimeridiane e muore il 19 maggio ore 12 antimeridiane.

Esperienza. 30 maggio 1907. — S'infettano due topolini di virus fisso sotto cute e dopo 24 ore si fanno due iniezioni al giorno per tre giorni di 1/4 di cmc., iniettando in tutto cmc. 1 $^1/_2$ di siero di cane immunizzato con un'emulsione di encefalo di coniglio rabbico 5 $^0/_0$ (2 iniezioni al giorno per 25 giorni di cmc. 2 $^1/_2$, iniettando in tutto 125 cmc.

Risultato. — Uno dei topolini presenta paralisi il 7 giugno ore 4 pomeridiane e muore l'8 giugno ore 7 antimeridiane e l'altro vive.

Esperienza di controllo. — Un ratto bianco viene infettato di virus fisso sotto cute.

Risultato. — L'animale presenta paralisi il 17 maggio ore 4 pomeridiane e muore il 18 maggio ore 7 antimeridiane.

II serie di esperienze.

a) *Siero di cane immunizzato con sostanza nervosa normale.*

Esperienza. 21 maggio 1907. — Ad un topolino albino infettato di virus fisso sotto cute si fanno tre iniezioni al giorno per due giorni di 1 $^1/_2$ cmc. di siero di cane immunizzato con un'emulsione di encefalo di bue sano 5 % (come sopra). Si principia 84 ore dopo l'infezione.

Risultato. — L'animale presenta paralisi il 29 maggio ore 8 pomeridiane e muore il 31 maggio ore 5 pomeridiane.

ESPERIENZA. 21 maggio 1907. — A un topolino albino infettato di virus fisso sotto cute si fanno tre iniezioni al giorno per due giorni di cmc. 1 $^1/_2$ di siero di cane immunizzato con un'iniezione di encefalo di bue sano 5 % (come sopra). Si principia questo trattamento 72 ore dopo l'infezione.

Risultato. — L'animale presenta paralisi il 27 maggio ore 8 antimeridiane e muore il 31 maggio ore 9 pomeridiane.

b) *Siero di coniglio immunizzato con sostanza nervosa rabbica.*

ESPERIENZA I. 21 maggio 1907. — Ad un topolino albino infettato di virus fisso sotto cute si fanno tre iniezioni al giorno per due giorni di 1 $^1/_2$ cmc. di siero di coniglio immunizzato con un'emulsione di encefalo di coniglio rabbico (virus fisso) 5 %, come sopra. Si principia questo trattamento 84 ore dopo l'infezione.

Risultato, — L'animale presenta paralisi il 3 giugno ore 7 antimeridiane e muore il 5 giugno ore 7 antimeridiane.

ESPERIENZA II. 21 maggio 1907. — Ad un topolino albino infettato di virus fisso sotto cute si fanno tre iniezioni al giorno per due giorni di 1 $^1/_2$ cmc. di siero di coniglio immunizzato con un'emulsione di encefalo di coniglio rabbico (virus fisso) 5 % come sopra. Si principia questo trattamento 72 ore dopo l'infezione.

Risultato. — L'animale presenta paralisi il 26 maggio ore 7 antimeridiane e muore il 26 maggio ore 12 pomeridiane.

ESPERIENZA DI CONTROLLO. 21 maggio 1907. — Due topolini albini vengono infettati di virus fisso sotto cute.

Risultato. — Uno degli animali presenta paralisi il 26 maggio ore 7 antimeridiane e muore il 29 maggio ore 8 pomeridiane; l'altro presenta pure paralisi il 26 maggio ore 7 antimeridiane e muore il 28 maggio ore 9 antimeridiane.

III SERIE DI ESPERIENZE.

a) *Siero di cane immunizzato con sostanza nervosa normale.*

ESPERIENZA I. 12 maggio 1907. — Ad un ratto bianco infettato di virus fisso sotto cute si fanno, principiando 48 ore dopo l'infezione, due iniezioni al giorno per tre giorni di 1 cmc. di siero di cane immunizzato per 25 giorni mediante due iniezioni al giorno con 2 $^1/_2$ cmc. di un'emulsione di encefalo di bue sano, iniettando in tutto 125 cmc.

Risultato, — L'animale presenta paralisi il 23 maggio ore 9 pomeridiane e muore il 25 ore 7 antimeridiane.

ESPERIENZA II. 12 maggio 1907. — S'infetta un ratto bianco sotto cute con un'emulsione di virus fisso e poscia, principiando 24 ore dopo l'infe-

zione, si fanno due iniezioni al giorno per tre giorni di 1 cmc. di siero di cane immunizzato con un'emulsione di encefalo di bue sano 5 ‰ 2 iniezioni, (2 ½ cmc.) al giorno per 25 giorni iniettando in tutto 125 cmc.

Risultato. — L'animale presenta paralisi il 20 maggio ore 7 antimeridiane e muore il 20 maggio ore 8 ½ pomeridiane.

Esperienza III. 30 maggio 1907. — A due topolini neri infettati di virus fisso sotto cute si fanno, principiando 24 ore dopo l'infezione, due iniezioni al giorno di 1/4 di cmc. per 3 giorni, iniettando in tutto cmc. 1 ½ di siero di cane immunizzato con un'emulsione di encefalo di bue sano 5 ‰ (2 iniezioni al giorno di cmc. 2 ½ per 25 giorni), iniettando in tutto cmc. 125.

Risultato. — Uno degli animali presenta paralisi il 3 maggio ore 10 antimeridiane e muore il 5 giugno ore 7 antimeridiane e l'altro vive.

Conclusione. — Da queste tre serie di esperienze risulta che il siero, tanto quello di cane immunizzato con sostanza nervosa normale, che quello ottenuto da cane immunizzato con sostanza nervosa rabbica (2 iniezioni al giorno di 2 ½ cmc. per 25 giorni) si comportò presso a poco nello stesso modo. Infatti tutti i muridi infettati di virus fisso sotto cute e trattati coi suddetti sieri (2 volte al giorno per 3-5 giorni in ragione di 1/4 di cmc. per iniezione) non se ne salvò nessuno principiando questo trattamento 84-72 ore dopo l'infezione; se ne salvò 1 su 3 di quelli nei quali il trattamento fu principiato 48 ore dopo: per altro devo notare che uno dei ratti trattati con siero di cane immunizzato con siero rabbico rimase paralizzato e poi guarì. Dei topolini poi dei quali si principiò il trattamento soltanto 24 ore dopo se ne salvò la metà (2 su 4) tanto di quelli trattati con un siero che con l'altro.

XIII. — Azione immunizzante del siero di cani e di conigli trattati con sostanza nervosa normale e rabbica iniettato dopo vario tempo dalla praticata infezione di virus di strada.

Istituii a questo proposito le esperienze seguenti:

I Serie con siero di cani.

Esperienze sui topolini.

a) *Siero di cani trattati con sostanza nervosa normale di agnello.*

Esperienza. 27 febbraio 1907. — A quattro topolini albini, infettati di virus di strada sotto cute, si fanno 2 iniezioni al giorno per 3 giorni di 1/4 di cmc. dello stesso siero di cane (immunizzato con emulsione di cervello di agnello sano mescolato con vaccino a parti eguali). Si principia

questo trattamento nel 1° topolino dopo 4 giorni, nel 2° dopo 6 giorni, nel 3° dopo 8 giorni, nel 4° dopo 10 giorni dall'infezione, iniettando in tutto a ciascuno cmc. 1 $^{1}/_{2}$.

Risultato. — I 3 topolini trattati dopo 3, dopo 6 e perfino dopo 8 giorni dall'infezione sopravvivono; muore invece quello nel quale si principia il trattamento dopo 10 giorni dall'infezione: presenta paralisi il 18 marzo e soccombe il 19 marzo, vale a dire dopo 20 giorni.

b) *Siero di cani trattati con sostanza nervosa rabbica di coniglio.*

ESPERIENZA. 27 febbraio 1907. — A 4 topolini albini, infettati di virus di strada sotto cute, si fanno 2 iniezioni al giorno per 3 giorni di 1/4 di cmc. dello stesso siero di cane (immunizzato con emulsione di virus fisso) mescolato con vaccino a parti eguali. Si principia questo trattamento nel 1° topolino dopo 4 giorni, nel 2° dopo 6 giorni, nel 3° dopo 8 giorni, nel 4° dopo 10 giorni dall'infezione, iniettando in tutto cmc. 1 $^{1}/_{2}$ per ciascuno.

Risultato. — I tre topolini iniettati di siero dopo 3, 6, 8 giorni dalla praticata infezione di virus di strada sopravvivono, muore invece quello iniettato di siero 10 giorni dopo.

ESPERIENZA DI CONTROLLO. 27 febbraio 1907. — Si infettano 2 topolini albini di virus di strada sotto cute.

Risultato. — Gli animali presentano paralisi il 18 marzo e muoiono il 19 marzo, cioè dopo 20 giorni.

ESPERIENZE SUI RATTI.

b) *Siero di cani trattati con sostanza nervosa normale di bue.*

ESPERIENZA. 12 maggio 1907 ore 8 pom. — Ad un ratto bianco infettato di virus di strada sotto cute, si fanno due iniezioni al giorno per tre giorni di 1 cmc. di siero di cane immunizzato con emulsione di encefalo di bue sano 5% (2 iniezioni di 2 $^{1}/_{2}$ cmc. al giorno per 25 giorni, iniettando in tutto 125 cmc.). Si principia questo trattamento 4 giorni dopo l'infezione, vale a dire il 16 maggio.

Risultato. — L'animale presenta paralisi il 9 giugno ore 11 antimeridiane e muore il 10 giugno, vale a dire dopo 38 giorni, con un ritardo di 11 giorni sui controlli e muore il 10 giugno ore 8 pomeridiane.

ESPERIENZA. 12 maggio 1907 ore 8 pom. — Ad un ratto infettato di virus di strada sotto cute si fanno due iniezioni al giorno per tre giorni di 1 cmc. di siero di cane immunizzato con emulsione di encefalo di bue sano. Si principia questo trattamento 6 giorni dopo l'infezione, vale a dire il 18 maggio.

Risultato. — L'animale muore per causa ignota dopo 6 giorni.

ESPERIENZA. 12 maggio ore 8 pom. — Ad un ratto infettato di virus di strada sotto cute si fanno due iniezioni al giorno per tre giorni di

1 cmc. di siero di cane immunizzato con un'emulsione di encefalo di bue sano. Si principia questo trattamento 8 giorni dopo l'infezione, vale a dire il 20 maggio.

Risultato. — L'animale muore per causa ignota dopo 12 giorni.

c) *Siero di cani trattati con sostanza nervosa normale di conigli*

Esperienza. 12 maggio 1907, ore 8 pom. — Ad un ratto bianco infettato di virus di strada, sotto cute si fanno due iniezioni al giorno per tre giorni di 1 cmc. di siero di cane immunizzato, con un'emulsione di encefalo di coniglio rabbico 5 ‰ (virus fisso) (2 iniezioni al giorno per 25 giorni, iniettando in tutto 125 cmc.). Si principia questo trattamento 4 giorni dopo l'infezione, vale a dire il 26 maggio.

Risultato. — L'animale sopravvive; viveva ancora l'8 giugno.

Esperienza. 12 maggio 1907, ore 8 pom. — Ad un ratto infettato di virus di strada, sotto cute si fanno due iniezioni al giorno per tre giorni di 1 cmc. di siero di cane immunizzato con un'emulsione di encefalo di coniglio rabbico (virus fisso). Si principia questo trattamento sei giorni dopo l'infezione, vale a dire il 28 maggio.

Risultato. — L'animale sopravvive.

Esperienza. 12 maggio 1907, ore 8 pom. — Ad un ratto infettato di virus di strada, sotto cute si fanno due iniezioni al giorno per tre giorni di 1 cmc. di siero di cane immunizzato con un'emulsione di encefalo di coniglio rabbico. Si principia questo trattamento 8 giorni dopo l'infezione, vale a dire il 20 maggio.

Risultato. — L'animale sopravvive.

Esperienza di controllo. — Un ratto bianco viene infettato di virus di strada sotto cute.

Risultato, — L'animale presenta paralisi il 28 maggio, ore 1 pom., e muore il 29 maggio, ore 9 pom.

Conclusione. — Dalla 1ª serie di queste esperienze istituite sui topolini non si trovò differenza tra i due sieri di cani. Infatti entrambi furono capaci di salvare gli animali anche principiando l'iniezione di siero 4-6 e perfino 8 giorni dalla praticata infezione del virus di strada.

Non così chiaro fu il risultato dell'esperienze istituite sui ratti: perchè mentre i tre ratti trattati con siero di cane immunizzato con emulsione di sostanza nervosa rabbica si salvarono, degli altri tre trattati con siero di sostanza nervosa normale, 1 solo, l'unico che si potè utilizzare (gli altri due morirono per causa ignota dopo 6-12 giorni), morì di rabbia benchè con un ritardo di 23 giorni.

II Serie con siero di conigli.

a) *Siero di conigli immunizzati con sostanza nervosa normale fresca.*

Esperienza. 12 maggio 1907. — Ad un coniglio del peso di kg. 1.900 si fanno 2 iniezioni al giorno per 20 giorni di 2 cmc. di emulsione fenicata di encefalo fresco di coniglio sano, iniettandone in tutto 80 cmc.

Il 20 giugno viene infettato sotto cute di virus fisso.

Risultato. — L'animale presenta paralisi il 28 giugno. Si uccide allora per dissanguamento lo stesso giorno. L'animale pesava kg. 1.750 (perdita gr. 150).

Col siero preparato si istituiscono le seguenti ricerche:

Esperienza I. 10 luglio 1907. — A tre topolini albini infettati di virus strada sotto cute, si fanno 2 iniezioni al giorno per 3 giorni di $^1/_4$ di cmc. di siero di sangue di coniglio immunizzato mediante una emulsione di encefalo fresco di coniglio sano, iniettando in tutto cmc. 1 $^1/_2$. Si principia questo trattamento dopo 6 giorni (16 luglio).

Risultato. — Uno dei topolini presenta paralisi il 25 luglio alle 7 ant. e muore lo stesso giorno alle 9 ant. Gli altri due sopravvivono.

Esperienza II. 10 luglio 1907. — Tre topolini albini infettati di virus strada si immunizzano come sopra. Il trattamento si principia dopo otto giorni (18 luglio).

Risultato. — Uno dei topolini presenta paralisi il 25 luglio ore 7 ant. e muore lo stesso giorno alle 9 ant. Gli altri due sopravvivono.

b) *Siero di conigli immunizzati con sostanza nervosa rabica fresca.*

Esperienza. 12 maggio 1907. — Ad un coniglio del peso di kg. 2.100 si fanno due iniezioni al giorno per 20 giorni di 2 cmc. di emulsione fenicata di encefalo fresco di coniglio rabido, iniettandone in tutto 80 cmc.

Il 20 giugno viene infettato nella cornea di virus fisso.

Risultato. — L'animale sopravvive. Il 4 luglio pesava kg. 1.750 (perdita 350 gr.).

Si uccide allora per dissanguamento, e se ne prepara il siero col quale si istituiscono queste ricerche:

Esperienza I. 10 luglio 1907. — A tre topolini albini infettati di virus strada sotto cute, si fanno 2 iniezioni al giorno per 3 giorni di $^1/_4$ di cmc. di siero di sangue di coniglio immunizzato mediante una emulsione di encefalo fresco di coniglio rabido, iniettando in tutto cmc. 1 $^1/_2$. Si principia questo trattamento dopo 6 giorni (16 luglio).

Risultato. — Uno dei topolini presenta paralisi il 24 luglio, ore 4 pom., e muore il 25 luglio, ore 7 ant. Un altro presenta paralisi il 12 agosto alle 7 ant. e muore il 12 agosto alle 8 pom. L'altro sopravvive.

Esperienza II. 10 luglio 1907. — Tre topolini albini infettati sotto cute di virus strada si immunizzano come sopra. Il trattamento si principia dopo 8 giorni (18 luglio).

Risultato. — Uno dei topolini presenta paralisi il 24 luglio, ore 7 ant., e muore il 24 luglio alle 4 pom. Un altro presenta paralisi il 12 agosto alle 7 ant. e muore il 12 agosto alle 8 pom. L'altro sopravvive.

c) *Siero di conigli immunizzati con sostanza nervosa normale disseccata.*

Esperienza. — Ad un coniglio del peso di kg. 2.200 si fanno 2 iniezioni al giorno per 20 giorni di 2 cmc. di emulsione fenicata di encefalo secco (3 giorni sulla soda caustica) di cane sano, iniettando in tutto 80 cmc.

Il 20 giugno viene infettato nella cornea di virus fisso.

Risultato. — L'animale sopravvive. Il 4 luglio pesava kg. 2.100 (perdita 100 gr). Si uccide allora per disanguamento e se ne prepara il siero col quale si istituiscono queste ricerche:

Esperienza I. 10 luglio 1907. — A tre topolini bianchi infettati di virus strada sotto cute si fanno 2 iniezioni al giorno per 3 giorni di $^1/_4$ di cmc. di siero di sangue di coniglio immunizzato con una emulsione di encefalo secco di cane sano, iniettando in tutto cmc. 1 $^1/_2$. Si principia questo trattamento dopo 6 giorni (16 luglio).

Risultato. — Gli animali presentano paralisi il 24 luglio, ore 7 ant., e muoiono tutti il 24 luglio alle 9 ant.

Esperienza II. 10 luglio 1907. — Tre topolini albini infettati sotto cute di virus strada si immunizzano come sopra. Il trattamento si principia dopo 8 giorni (18 luglio).

Risultato. — Gli animali presentano paralisi il 24 luglio alle 7 ant.; 2 muoiono il 24 luglio alle 9 ant. e l'altro muore il 25 luglio alle 4 pom.

d) *Siero di conigli immunizzati con sostanza nervosa rabica disseccata.*

Esperienza. — Ad un coniglio del peso di kg. 1.700 si fanno 2 iniezioni al giorno per 20 giorni di 2 cmc. di emulsione fenicata di encefalo secco (3 giorni sulla soda a 20°) di coniglio rabido, iniettando in tutto 80 cmc.

Il 20 giugno l'animale viene infettato di virus fisso nella cornea.

Risultato. — L'animale sopravvive. Il 4 luglio non aveva perduto nulla del suo peso. Si uccide allora per disanguamento e se ne prepara il siero col quale si istituiscono queste ricerche:

Esperienza I. 10 luglio 1907. — A tre topolini albini infettati sotto cute di virus di strada si fanno 2 iniezioni al giorno per 3 giorni di $^1/_4$ di cmc. di siero di sangue di coniglio immunizzato con encefalo secco di coniglio rabido. iniettando in tutto cmc. 1 $^1/_2$. Si principia questo trattamento dopo 6 giorni (16 luglio).

Risultato. — Uno dei topolini presenta paralisi il 25 luglio, ore 9 ant., e muore il 26 luglio, ore 7 pom. Gli alri due sopravvivono.

Esperienza II. 10 luglio 1907. — Tre topolini albini infettati sotto cute di virus strada si immunizzano come sopra. Il trattamento si principia dopo 8 giorni (18 luglio).

Risultato. — Gli animali presentano paralisi il 24 luglio, 7 pom., e muoiono tutti di rabbia il 25 luglio, 7 ant.

Esperienza di controllo. 10 luglio 1907. — Due topolini albini vengono infettati di virus di strada sotto cute.

Risultato. — Gli animali presentano paralisi il 24 luglio, 7 ant., e muoiono uno il 25 luglio, 7 ant., e l'altro il 25 luglio, 9 ant.

Conclusione. — Da queste esperienze risulta:

1° Che il siero di conigli immunizzati con sostanza nervosa fresca, sia normale che rabida, salvò il 66 % dei topolini infettati previamente di virus di strada;

2° Che il siero di conigli immunizzati con sostanza nervosa disseccata normale non salvò alcuno degli animali, mentre il siero di conigli trattati con sostanza nervosa rabica, pure disseccata, salvò il 33 % dei topolini.

XIV. — Potere immunizzante del siero di sangue di animali sani.

Come esperienza di confronto alle esperienze istituite col siero di animali immunizzati credetti opportuno assaggiare pure il potere del siero di sangue di animali sani.

Esperienza I. 22 aprile 1907. — A tre topolini neri infettati di virus fisso, sotto cute si fanno due iniezioni al giorno per 5 giorni di $^1/_4$ di cmc. di siero di cane sano, iniettando in tutto cmc. 2 $^1/_2$.

Risultato — Uno dei topolini muore il 30 aprile alle ore 8 pom., probabilmente di rabbia; un altro presenta paralisi il 3 maggio alle 8 antimeridiane e muore il 3 maggio alle 3 pom.; un altro presenta paralisi il 3 maggio alle 9 ant. e muore il 4 maggio alle 8 ant.

Esperienza II. — 3 maggio 1907. — A tre topolini neri infettati di virus fisso, sotto cute si fanno due iniezioni al giorno per 3 giorni di $^1/_4$ di cmc. di siero di cane sano, iniettando in tutto cmc. 1 $^1/_2$.

Risultato. — Due topolini presentano paralisi il 7 maggio, ore 9 pomeridiane, e muoiono l'8 maggio, ore 7 ant.; il terzo sopravvisse.

Esperienza III. 3 maggio 1907. — A tre topolini neri infettati di virus fisso, sotto cute si fanno due iniezioni al giorno per quattro giorni di $^1/_4$ di cmc. di siero di cane sano, iniettando in tutto 2 cmc.

Risultato. — Uno dei topolini presenta paralisi l'8 maggio, ore 7 antimeridiane, e muore il 10 maggio, ore 9 pom., vale a dire dopo sette giorni; un altro presenta paralisi il 13 maggio, ore 7 ant., e muore il 13 maggio, ore 8 pom.; vale a dire dopo 10 giorni con un ritardo sui controlli di 4 giorni. Il terzo sopravvive. I due animali morti hanno presentato un ritardo di 2-5 giorni sui controlli.

ESPERIENZA DI CONTROLLO. 3 maggio 1907. Si infettano due topolini albini sotto cute.
Risultato. — Gli animali presentano paralisi il 7 maggio, ore 7 ant. e muoiono l'8 maggio, ore 7 ant.

Conclusione. — Il siero di sangue di cane sano, a differenza del siero di sangue di cane immunizzato è sprovvisto quasi completamente di potere immunizzante contro l'infezione sottocutanea di virus fisso.
Difatti, di 9 topolini infettati di virus fisso e trattati con due iniezioni al giorno di $1/4$ di cmc. per iniezione per 4 o 5 giorni, ne morirono 7 di rabbia.

XV. — Potere immunizzante del siero di animali immunizzati con sostanza nervosa normale e rabbica mescolato al vaccino.

Alla quistione del potere immunizzante del siero-vaccino ritenni opportuno dedicare diverse esperienze.

I SERIE.

a) *Siero di sangue di cane trattato con sostanza nervosa normale.*

ESPERIENZA I. 20 febbraio 1907. — Si infetta un topolino bianco come sopra e poscia si pratica al medesimo un'iniezione al giorno per 3 giorni di $1/4$ di cmc. di una mescolanza di siero e vaccino (10 %) parti uguali. iniettando in tutto $3/4$ di cmc.
Risultato. — L'animale sopravvive.

ESPERIENZA II. 20 febbraio 1907. — Si infetta un topolino bianco come sopra e poscia si praticano al medesimo 2 iniezioni al giorno per 3 giorni di $1/4$ di cmc. della suddetta miscela di siero vaccino iniettando in tutto cmc. 1 $1/2$.
Risultato. — L'animale sopravvive.

ESPERIENZA III. 20 febbraio 1907. — Si infettano 2 topolini neri come sopra e poscia si praticano ad essi 2 iniezioni al giorno per 5 giorni di $1/4$ di cmc. della suddetta miscela di siero-vaccino, iniettandone in tutto cmc. 2 $1/2$ per ciascuno.
Risultato. — Gli animali sopravvivono.

b) *Siero di sangue di cane trattato con sostanza nervosa rabbica.*

ESPERIENZA IV. 16 marzo 1907. — A 6 topolini bianchi infettati di virus fisso sotto cute, si fanno 2 iniezioni al giorno per 3 giorni di $1/4$ di cmc. di una miscela di siero di cane (immunizzato con emulsione di virus fisso al 10 % iniettandone 5 cmc. al giorno per 25 giorni) ed emulsione di

virus fisso al 10 % a parti eguali, dopo che questa miscela era rimasta per 15 ore alla temperatura di 15°, iniettandone in tutto cmc. 1 ½ per ciascuno.

Risultato. — Tutti gli animali sopravvivono.

ESPERIENZA DI CONTROLLO. 16 marzo 1907. — 2 topolini albini vengono infettati sotto cute con $^1/_4$ di cmc. di emulsione di virus fisso.

Risultato. — Gli animali presentano paralisi il 21 marzo e muoiono il 22 marzo, cioè dopo 6 giorni.

Conclusione. — Da queste esperienze risulta:

Che l'efficacia del siero di cane immunizzato con sostanza nervosa normale, sarebbe uguale all'efficacia del siero di cane immunizzato con virus fisso: diffatti il siero di cane (immunizzato mediante un iniezione al giorno di 5 cmc. per 25 giorni di emulsione di virus fisso fenicato) mescolato a parti uguali con emulsione di virus fisso fresco al 10 %, e iniettato nella proporzione di cmc. 1 ½ in 3 giorni, è stato capace di salvare i topolini previamente infettati di virus fisso.

II SERIE.

a) *Siero di sangue di cane trattato con sostanza nervosa normale.*

ESPERIENZA I. 16 marzo 1907. — A 2 topolini albini infettati di virus fisso sotto cute, si fanno 2 iniezioni al giorno per 5 giorni di $^1/_4$ di cmc. di una mescolanza di siero e vaccino (10 %) a parti eguali, iniettandone in tutto cmc. 2 ½ per ciascuno. Si principia questo trattamento 24 ore dopo l'infezione.

Risultato. — Gli animali sopravvivono.

ESPERIENZA II. 16 marzo 1907. — A 2 topolini albini infettati di virus fisso sotto cute, si fanno 2 iniezioni al giorno per 4 giorni di $^1/_4$ di cmc. della suddetta miscela, iniettandone in tutto 2 cmc. per ciascuno. Si principiò questo trattamento 48 ore dopo l'infezione.

Risultato. — Un topolino sopravvive ed un altro presenta paralisi il 25 marzo e muore il 26 marzo.

ESPERIENZA III. 16 marzo 1907. — A 2 topolini albini infettati sotto cute di virus fisso, si fanno 2 iniezioni al giorno per 3 giorni di $^1/_4$ di cmc. della suddetta miscela, iniettandone in tutto cmc. 1 ½ per ciascuno. Si principia questo trattamento 72 ore dopo l'infezione.

Risultato. — I 2 topolini presentano paralisi il 22 marzo e muoiono lo stesso giorno.

b) *Siero di cani trattati con sostanza nervosa rabbica.*

ESPERIENZA I. 16 marzo 1907. — A 2 topolini albini infettati di virus fisso sotto cute, si fanno 2 iniezioni al giorno per 5 giorni di $^1/_4$ di cmc. di una mescolanza di siero e vaccino (10 %) a parti eguali, iniettandone

in tutto cmc. 2 ½ per ciascuno. Si principia questo trattamento 24 ore dopo l'infezione.

Risultato. — Gli animali sopravvivono.

Esperienza II. 16 marzo 1907. — A 2 topolini albini infettati di virus fisso sotto cute, si fanno 2 iniezioni al giorno per 4 giorni di ¼ di cmc. della suddetta miscela, iniettandone in tutto 2 cmc. per ciascuno. Si principiò questo trattamento 48 ore dopo l'infezione.

Risultato. — Un animale presenta paralisi il 25 marzo ore 8 ant. e muore il 26 marzo ore 10 ant.; l'altro sopravvive.

Esperienza III. 16 marzo 1907. — A 2 topolini albini infettati sotto cute di virus fisso, si fanno 2 iniezioni al giorno per 3 giorni di ¼ di cmc. della suddetta miscela, iniettandone in tutto cmc. 1 ½ per ciascuno. Si principia questo trattamento 72 ore dopo l'infezione.

Risultato. — Gli animali presentano paralisi il 21 marzo ore 8 ant. e muoiono lo stesso giorno alle ore 7 pom.

Esperienza di controllo. 16 marzo 1907. — Due topolini infettati di virus fisso muoiono di rabbia il 22 marzo.

Conclusione. — Da queste esperienze risulta quindi:

1° che la mescolanza a parti eguali di siero di cane (immunizzato con 25 iniezioni di 5 cmc. ciascuna di emulsione fenicata di sostanza nervosa normale e rabica 10 %) ed emulsione fenicata di virus fisso, iniettata 2 volte al giorno per 5 giorni in ragione di ¼ di cmc. per iniezione, salvò gli animali principiando il trattamento anche 24 ore dopo l'infezione;

2° che principiando invece 48 ore dopo l'infezione, vale a dire circa 3 giorni avanti la comparsa dei primi sintomi, si salvò soltanto 1 su 2 degli animali,

3° che il trattamento fu invece totalmente inefficace principiandolo 3 giorni dopo l'infezione vale a dire 2 giorni avanti la comparsa dei primi sintomi;

4° che quindi la sostanza nervosa normale si è comportata come la sostanza nervosa rabica.

III Serie.

a) *Siero di sangue di coniglio immunizzato con sostanza nervosa normale.*

Anzitutto principiai coll'immunizzazione dei conigli:

Esperienza I. 2 febbraio 1907. — Ad un coniglio del peso di kg. 2.400 si fa un'iniezione sotto cute al giorno per 20 giorni di 2 cmc. per iniezione, iniettando in tutto 40 cmc. di emulsione di cervello di agnello sano 5 %, contenente acido fenico al ½ %. Il 14 marzo, cioè dopo 20

giorni dall'ultima iniezione, si estrae tutto il sangue dal coniglio e se ne prepara il siero, che si conserva coll'aggiunta del ½ % di acido fenico.

Esperienza II. 2 febbraio 1907. — Un altro coniglio del peso di kg. 2.200 viene immunizzato come sopra, e dopo 20 giorni si uccide parimenti per dissanguamento e se ne prepara il siero.

Ciò fatto passai a provare la

Miscela di virus fisso e di siero di coniglio immunizzato con sostanza nervosa normale.

Esperienza III. 27 febbraio 1907. — Ad un topolino albino infettato di virus fisso sotto cute, si fanno, principiando 48 ore dopo l'infezione, 2 iniezioni al giorno di $^1/_4$ di cmc per 3 giorni di una miscela a parti eguali di siero di coniglio (immunizzato con 32 cmc. di emulsione fenicata di cervello di agnello sano 5 %) e vaccino fenicato.
Risultato. — L'animale sopravvive.

Esperienza IV. 27 febbraio 1907. — Ad un topolino albino infettato di virus fisso sotto cute si fanno, principiando 72 ore dopo l'infezione, una iniezione al giorno di $^1/_4$ di cmc. per 3 giorni della suddetta miscela di siero di coniglio e vaccino fenicato.
Risultato. — L'animale sopravvive.

b) *Siero di sangue di coniglio immunizzato con sostanza nervosa rabica.*

Esperienza I. 2 febbraio 1907. — Ad un coniglio del peso di kg. 2.400 si fa un'iniezione sotto cute al giorno per 20 giorni di cmc. per iniezione, iniettando in tutto 40 cmc. di emulzione di virus fisso 5 %, contenente acido fenico al ½ %. Il 14 marzo, cioè dopo 20 giorni dall'ultima iniezione, si estrae tutto il sangue dal coniglio e se ne prepara il siero, che si conserva coll'aggiunta del ½ % di acido fenico.

Esperienza II. 2 febbraio 1907. — Un altro coniglio del peso di kg. 2.300 viene immunizzato come sopra, e dopo 20 giorni si uccide parimenti per dissanguamento e se ne prepara il siero.

Ciò fatto passai a provare la

Miscela di virus fisso e di siero di coniglio immunizzato con sostanza nervosa rabica.

Esperienza III. 27 febbraio 1907. — Ad un topolino albino infettato di virus fisso sotto cute, si fanno, principiando 48 ore dopo l'infezione, 2 iniezioni al giorno di $^1/_4$ di cmc. per 3 giorni di una miscela a parti eguali di siero di coniglio immunizzato con una emulsione fenicata di virus fisso 5 % e vaccino fenicato.
Risultato. — L'animale sopravvive.

ESPERIENZA IV. 27 febbraio 1907. — Ad un topolino albino infettato di virus fisso sotto cute, si fanno, principiando 72 ore dopo l'infezione, una iniezione al giorno di $^1/_4$ di cmc. per 3 giorni della suddetta miscela di siero di coniglio e vaccino fenicato.

Risultato. — L'animale sopravvive.

ESPERIENZA DI CONTROLLO. — 2 topolini albini vengono infettati sotto cute di virus fisso.

Risultato. — Gli animali presentano paralisi il 4 marzo, ore 9 ant. e muoiono lo stesso giorno alle ore 12 ant.

Conclusione. — Da queste esperienze risulta che il siero di conigli immunizzati con 32 cmc. di emulsione fenicata di sostanza nervosa normale e rabica mescolato a parti uguali con emulsione fenicata di virus fisso 10 %, riuscì a salvare gli animali infettati previamente di virus fisso, praticando per 3 giorni una sola iniezione al giorno di $^1/_4$ di cmc., principiando anche 72 ore dopo l'avvenuta infezione. Anche in questo caso il siero di animali trattati con sostanza nervosa normale, avrebbe dimostrato lo stesso potere del siero di animali trattati con sostanza nervosa rabica.

IV SERIE.

a) *Miscela di siero di sangue di coniglio immunizzato con sostanza nervosa normale e virus fisso provata sui ratti dopo alcun tempo dall'infezione di virus fisso.*

ESPERIENZA. 21 maggio ore 8 ant. — Ad un ratto bianco infettato di virus fisso sotto cute, si fanno tre iniezioni al giorno per tre giorni di 1 cmc. di una miscela a parti uguali di vaccino e di siero di coniglio immunizzato con un'emulsione di encefalo di bue sano, 5 % (2 iniezioni al giorno per 25 giorni di 2 cmc. In tutto 100 cmc.). Si principia il trattamento 72 ore dopo l'infezione.

Risultato. — L'animale presenta paralisi il 25 maggio ore 7 pomeridiane e muore il 26 maggio ore 12 pomeridiane.

ESPERIENZA 17 maggio, ore 8 ant. — Ad un ratto bianco infettato di virus fisso sotto cute, si fanno tre iniezioni al giorno per tre giorni di 1 cmc., di una miscela in parti eguali di vaccino e di siero di coniglio immunizzato con un'emulsione di encefalo di bue sano 5 % (2 iniezioni al giorno per 25 giorni di 2 cmc. In tutto 100 cmc.). Si principia questo trattamento 84 ore dopo l' infezione.

Risultato. — L'animale sopravvive.

b) *Miscela di siero di sangue di coniglio immunizzato con sostanza nervosa rabbica e virus fisso provata sui ratti dopo alcun tempo dall'infezione di virus fisso.*

ESPERIENZA 16 maggio, ore 8 pom. — Un ratto bianco infettato (come sopra) si tratta parimenti con una miscela di vaccino e di siero di coniglio immunizzato (come sopra) con un emulsione di encefalo di coniglio rabbico (virus fisso) 5 %. Si principia questo trattamento 72 ore dopo l'infezione.

Risultato. — L'animale presenta paralisi il 25 maggio ore 7 pomeridiane o muore il 26 maggio ore 12 pomeridiane.

ESPERIENZA 16 maggio, ore 8 pom. — Ad un ratto bianco infettato di virus fisso sotto cute, si fanno tre iniezioni al giorno e per tre giorni di 1 cmc., di una miscela in parti eguali di vaccino e di siero di coniglio immunizzato con un'emulsione di encefalo di coniglio rabbico 5 % (2 iniezioni al giorno per 25 giorni di 2 cmc.). Si principia questo trattamento 84 ore dopo l'infezione.

Risultato. — L'animale presenta paralisi il 26 maggio ore 7 antimeridiane e muore il 28 maggio ore 9 pomeridiane.

Conclusione. — Da queste esperienze risulta quindi: che la mescolanza a parti eguali di virus fisso e di siero di coniglio, immunizzato con sostanza nervosa normale, si comportò come la mescolanza di virus fisso e di siero di coniglio immunizzato con sostanza nervosa rabbica. Diffatti sui ratti infettati di virus fisso, principiando il trattamento 72 e 84 ore dopo l'infezione, gli animali soccombettero tutti ad eccezione di un ratto trattato con la miscela di virus fisso e siero di sangue di coniglio immunizzato con sostanza nervosa normale. Naturalmente che a questo accidentale vantaggio del siero di sangue di coniglio immunizzato con sostanza nervosa normale, non si deve attribuire nessunissimo valore.

V SERIE.

a) *Miscela di siero di sangue di coniglio immunizzato con sostanza nervosa normale e virus fisso provata su ratti dopo alcun tempo dall'infezione di virus.*

ESPERIENZA 17 maggio, ore 10 ant. — Ad un ratto bianco infettato di virus strada sotto cute, si fanno tre iniezioni al giorno per tre giorni di 1 cmc. di una miscela a parti eguali di vaccino e siero di coniglio immunizzato con una emulsione di encefalo di bue sano 5 °/₀ (2 iniezioni al giorno per 25 giorni di 2 cmc., in tutto 100 cmc.). Si principia questo trattamento 6 giorni dopo l'infezione.

Risultato. — L'animale sopravvive.

Esperienza 22 maggio, ore 8 ½ ant. — Ad un ratto bianco infettato di virus di strada sotto cute, si fanno tre iniezioni per tre giorni di 1 cmc., di una miscela in parti uguali di vaccino e siero di coniglio immunizzato con una emulsione di encefalo di bue sano, 5 °/₀ (2 iniezioni al giorno per 25 giorni di 2 cmc. In tutto 100 cmc.). Si principia questo trattamento 8 giorni dopo l'infezione.

Risultato. — L'animale sopravvive. Viveva ancora l'8 giugno.

b) ***Miscela di sangue di coniglio immunizzato con sostanza nervosa rabbica e virus fisso provata sui ratti dopo alcun tempo dall'infezione di virus di strada.***

Esperienza 16 maggio, ore 8 ½ pom. — Ad un ratto bianco infettato di virus di strada sotto cute, si fanno tre iniezioni al giorno per tre giorni di 1 cmc. di una miscela a parti eguali di vaccino e siero di coniglio rabbico (virus fisso) immunizzato con un'emulsione di encefalo di bue sano, 5 °/₀ (2 iniezioni al giorno per 25 giorni di 2 cmc. In tutto 100 cmc.). Si principia questo trattamento 6 giorni dopo l'infezione.

Risultato. — L'animale sopravvive. Viveva ancora l'8 giugno.

Esperienza 16 maggio, ore 8 ½ pom. — Ad un ratto bianco infettato di virus di strada sotto cute, si fanno tre iniezioni al giorno per tre giorni di 1 cmc. di una miscela a parti eguali di vaccino e siero di coniglio immunizzato con una emulsione di encefalo di coniglio rabbico 5 °/₀ (virus fisso). Si principia questo trattamento 8 giorni dopo l'infezione.

Risultato. — L'animale sopravvive.

Esperienza di controllo 18 maggio. — Un ratto bianco viene infettato di virus di strada sotto cute.

Risultato. — L'animale presenta paralisi il 2 giugno ore 9 antimeridiane e muore il 3 giugno ore 8 pomeridiane.

Conclusione. — Da queste esperienze risulta quindi: che la mescolanza a parti uguali di virus fisso e di siero di coniglio immunizzato con sostanza nervosa normale, si comportò come la mescolanza di virus fisso e di siero di coniglio immunizzato con sostanza nervosa rabbica. Diffatti i ratti infettati di virus di strada, principiando il trattamento 6 e 8 giorni dopo l'infezione, sopravvissero tutti.

Conclusione finale. — Da queste 5 serie di esperienze istituite su 35 muridi risultò quanto segue:

1° che la mescolanza di virus fisso e siero di sangue di animali (cane, coniglio) immunizzati con sostanza nervosa normale si comportò identicamente come la mescolanza di virus fisso e siero di animali immunizzati con sostanza nervosa rabbica.

Difatti, di 17 muridi trattati con la mescolanza di virus fisso e siero di animali immunizzati con sostanza nervosa normale se ne

salvarono 13, vale a dire il 77 %; e di 18 muridi trattati con miscela di virus fisso e siero di animali immunizzati con sostanza nervosa rabbica se ne salvarono 13, vale a dire il 73 %;

2° che la miscela a parti eguali di siero di sangue di cane e di siero immunizzato, con l'una e l'altra sostanza nervosa, salvò tutti gli animali infettati di virus fisso sotto cute principiando il trattamento anche 24 ore dopo l'infezione;

3° che salvò soltanto 1 su 2 degli animali principiando il trattamento 48 ore dopo, e che riuscì totalmente inefficace principiando 72-84 ore dopo.

Più efficace sarebbe stata la mescolanza di siero di sangue di coniglio e vaccino imperocchè sarebbe riuscita a salvare diversi muridi anche dopo 72 ore. Essendo per altro in questo caso il numero dei muridi esperimentati molto scarso, il risultato ha bisogno di essere confermato con altre ricerche;

4° che la mescolanza di siero di coniglio e vaccino fu capace di salvare i muridi infettati di virus di strada anche 6-8 giorni dopo le praticate infezioni;

5° che la mescolanza di siero e vaccino sembra in realtà essere più efficace del siero solo, infatti abbiamo: *a*) che dei muridi infettati di virus fisso e trattati col solo siero principiando 24 ore dopo se ne salvò soltanto la metà, mentre quelli trattati col siero vaccino si salvarono tutti; *b*) che principiando 48 ore dopo ne sopravvissero 1 su 3, mentre col siero vaccino, ne sopravvisse la metà; *c*) che principiando il trattameuto 72-84 ore dopo, il siero vaccino sarebbe riuscito a salvare qualcuno degli animali; che nessuna differenza si trovò invece tra il siero solo e il siero vaccino nei muridi infettati di virus di strada, perchè tutti gli animali, anche principiando il trattamento 6-8 giorni dopo l'infezione, si salvarono.

XVI. — **Azione neutralizzante del siero di animali immunizzati con una emulsione fenicata di sostanza nervosa normale e rabica sul virus fisso fresco in vitro.**

Le esperienze istituite in proposito furono le seguenti:

a) *Siero di cani trattati con sostanza nervosa normale.*

Esperienza I. 16 marzo 1907. — A 2 topolini albini si inietta $^1/_4$ di cmc. di una miscela composta di 1 cmc. di virus fisso fresco 1 %, 2 cmc. di siero di cane (immunizzato mediante 25 iniezioni di 5 cmc. ciascuna di

emulsione fenicata di cervello di agnello sano), rimasta 24 ore alla temperatura di 15°.

Risultato. — Gli animali sopravvivono.

Esperienza II. 16 marzo 1907. — A 2 topolini albini si inietta $^1/_4$ di cmc. di una miscela composta di 1 cmc. di virus fisso fresco 1 % + 1 cmc. del suddetto siero.

Risultato. — Gli animali sopravvivono.

Esperienza III. 16 marzo 1907. — A 2 topolini albini si inietta $^1/_4$ di cmc. di una miscela composta di 1 cmc. di virus fisso fresco 1 % + 0.5 cmc. del suddetto siero.

Risultato. — Gli animali sopravvivono.

Esperienza IV. 16 marzo 1907. — A 2 topolini albini si inietta $^1/_4$ di cmc. di una miscela composta di 1 cmc. di virus fisso fresco 1 % + 0.1 cmc. del suddetto siero.

Risultato. — Gli animali sopravvivono.

b) *Siero di cani trattati con sostanza nervosa rabica.*

Esperienza I. 16 marzo 1907. — A 2 topolini albini si inietta $^1/_4$ di cmc. di una miscela composta di 1 cmc. di virus fisso fresco 1 % + 0.1 cmc. di siero di cane (immunizzato mediante 25 iniezioni di 5 cmc. ciascuna di emulsione fenicata di virus fisso), rimasta 24 ore alla temperatura di 15°.

Risultato. — Gli animali sopravvivono.

Esperienza II. 16 marzo 1907. — A 2 topolini albini si inietta $^1/_4$ di cmc. di una miscela composta di 1 cmc. di virus fisso fresco 1 % + 0.5 cmc. del suddetto siero.

Risultato. — Gli animali sopravvivono.

Esperienza III. 16 marzo 1907. — A 2 topolini albini si inietta $^1/_4$ di cmc. di una miscela composta di 1 cmc. di virus fisso fresco 1 % + 1 cmc. del suddetto siero.

Risultato. — Gli animali sopravvivono.

Esperienza IV. 16 marzo 1907. — A 2 topolini albini si inietta $^1/_4$ di cmc. di una miscela composta di 1 cmc. di virus fisso fresco 1 % + 2 cmc. del suddetto siero.

Risultato. — Gli animali sopravvivono.

Conclusione. — Da queste quattro esperienze risulta che il siero di cani (immunizzati mediante 25 iniezioni di 5 cmc. ciascuna di emulsione fenicata di sostanza nervosa normale e rabica 5 %), fu capace di neutralizzare in vitro il virus fisso: 1 di siero neutralizzò 10 volte tanto il suo volume di virus fisso. Dosi inferiori di siero non vennero provate.

Esperienza V. 14 maggio 1907, ore 4 pom. — A 6 topolini albini si inietta sotto cute $^{1}/_{4}$ di cmc. di miscele composte di 1 cmc. di virus fisso conservato in glicerina all' 1: 500 e rispettivamente 0.05, 0.01, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 di siero di cane immunizzato per 25 giorni con 2 iniezioni al giorno di cmc. 2 $^{1}/_{2}$. Iniettando, in tutto 125 cmc. di un'emulsione fenicata ($^{1}/_{2}$ %) di encefalo di bue sano al 5 %. Queste miscele di siero e di emulsione di virus fisso erano rimaste per tre ore alla temperatura di 19 gradi.
Risultato. — Tutti gli animali sopravvivono.

Esperienza VI. 29 maggio 1907, ore 1 pom. — A 5 topolini albini si inietta sotto cute $^{1}/_{4}$ di cmc. di miscele composte di 1 cmc. di virus fisso fresco all'1: 500 e rispettivamente 0.05, 0.01, 0.2, 04, 0.6, 08 di siero di cane immunizzato di un'emulsione fenicata ($^{1}/_{2}$ %) di encefalo di bue sano al 5 % (2 iniezioni al giorno di 2.5 cmc. per 25 giorni). Il cane venne ucciso 29 giorni dopo l'ultima iniezione. Queste miscele di siero e di emulsione di virus fisso fresco erano rimaste per tre ore alla temperatura di 19 gradi.
Risultato. — Il topolino inoculato colla miscela di virus fisso più 0.05 di siero presenta paralisi l'8 giugno, ore 7 ant. e muore l'8 giugno ore 8 pom. Gli altri 4 sopravvivono.

Quindi in queste due esperienze il siero di sangue di cane immunizzato con emulsione di encefalo di bue sano sarebbe stato capace nella dose di 0.05-0.1 cmc. di neutralizzare 1 cmc. di una emulsione di virus fisso all'1: 500. Ora, siccome la dose minima di virus fisso dell'Istituto Antirabbico di Sassari capace di uccidere un topolino per via sottocutanea è di $^{1}/_{4}$ di cmc. di un'emulsione all'1 : 50000, la potenza lissicida del suddetto siero sarebbe stata capace di neutralizzare un forte numero di unità infettanti.

Esperienza di controllo. 29 maggio 1907. — A 2 topolini albini si inietta sotto cute $^{1}/_{4}$ di cmc. di emulsione dello stesso virus fisso all'1:1000.
Risultato. — Uno degli animali presenta paralisi il 7 giugno ore 4 pom. e muore il 9 giugno ore 7 ant.

Esperienza. 14 maggio 1907, ore 4 pom. — A 6 topolini albini si inietta sotto cute un quarto di cmc. di miscele composte di 1 cmc. di virus fisso conservato in glicerina all'1 : 500, e rispettivamente 0.05 0.01 0.2 0.4 0.6 0.8 di siero di cane immunizzato per 25 giorni mediante due iniezioni 2 $^{1}/_{2}$ cmc. di un' emulsione fenicata ($^{1}/_{2}$ %) di encefalo di coniglio rabbico (virus fisso 5 %, iniettando in tutto 125 cmc. di emulsione. Queste miscele di siero e di emulsione di virus fisso erano rimaste per tre ore alla temperatura di 19 gradi.
Risultato. — Tutti gli animali sopravvivono. Uno solo fu trovato morto il 2 giugno alle ore 7 ant. per causa ignota.

Come si vede il siero di sangue di cane con vaccino rabbico, è stato capace come il siero di sangue di cane immunizzato con sostanza nervosa normale, di neutralizzare lo stesso numero di unità infettanti di virus fisso.

Esperienza di controllo. 14 giugno, ore 4 pom. — A 2 topolini albini si inietta sotto cute $^{1}/_{4}$ di cmc. di un'emulsione dello stesso virus fisso all'1 : 1000.

Risultato. — Uno dei topolini presenta paralisi il 27 maggio alle 8 antimeridiane e muore il 30 maggio alle 9 pom.; l'altro presenta paralisi il 30 maggio, ore 11 ant. e muore il 30 maggio, ore 9 pom.

Il ritardo nella morte degli animali di controllo si spiega col leggiero attenuamento avvenuto nella glicerina del virus fisso.

Conclusione. — Da queste diverse esperienze risulta quindi che il siero di sangue di cane immunizzato con sostanza nervosa normale possiede lo stesso potere neutralizzante del siero di cane immunizzato con vaccino rabbico: 0.05 tanto dell'uno che dell'altro siero fu capace di neutralizzare lo stesso numero di unità infettanti contenuto in 1 cmc. di emulsione di virus fisso all' 1 : 500, sapendosi che la dose minima di virus fisso dell' Istituto antirabbico di Sassari, infettante per un topolino, è di ¼ di cmc. di un'emulsione all' 1 : 50,000.

XVII. — Differenza tra il potere immunizzante della sostanza nervosa normale secondo la specie dell'animale.

Dopo che già avevo trovato qualche differenza sul potere immunizzante contro la rabbia della sostanza nervosa normale di alcuni mammiferi (cane, bue, pecora, coniglio), volli vedere se maggiori differenze si riscontravano colla sostanza nervosa di uccelli e di animali a sangue freddo (rana).

Le esperienze istituite in proposito furono le seguenti:

a) *Sostanza nervosa normale di tacchino.*

Esperienza. 19 aprile 1907. — A tre ratti albini infettati di virus di strada sotto cute si fanno due iniezioni al giorno per 15 giorni di 1 cmc. di un'emulsione fenicata di encefalo di tacchino al 10 %.

Risultato. — Uno degli animali muore per causa ignota il 13 maggio. Un altro presenta paralisi il 24 agosto ore 12 e muore il 20 agosto alle 7 ant. Il terzo fu trovato morto il 14 agosto ore 7 ant.

b) *Sostanza nervosa normale di pollo.*

Esperienza. 19 aprile 1907. — A tre ratti albini infettati di virus di strada sotto cute si fanno due iniezioni al giorno per 15 giorni di 1 cmc. di un'emulsione fenicata di encefalo di pollo al 10 %.

Risultato. — Uno degli animali presenta paralisi il 2 maggio, ore 8 pomeridiane e muore il 3 maggio ore 7 ant.; un altro presenta paralisi il 3 maggio, ore 9 ant. e muore il 3 maggio, ore 8 pom.; il terzo presenta paralisi il 3 maggio, ore 11 ant. e muore il 4 maggio, ore 11 ant.

c) *Sostanza nervosa normale di rana.*

ESPERIENZA I. 19 aprile 1907. — A tre ratti albini infettati di virus di strada sotto cute si fanno due iniezioni al giorno per 15 giorni di 1 cmc. di un'emulsione fenicata di encefalo di rana al 10 %.

Risultato. — Uno dei ratti muore il 26 aprile, cioè dopo 7 giorni per causa ignota; un altro presenta incerta paralisi il 27 aprile, ore 9 ant. e muore lo stesso giorno alle 4 pom., non si sa se di rabbia, il terzo presenta paralisi il 7 maggio, ore 7 ant. e muore l'8 maggio, ore 12, vale a dire dopo 19 giorni.

ESPERIENZA II. 29 aprile 1907. — Si ripete l'esperienza su altri 3 ratti, due neri e uno bianco.

Risultato. — Uno fu trovato morto il 4 maggio, cioè dopo 6 giorni, un altro l'8 maggio, cioè dopo 9 giorni per causa ignota ed il terzo sopravvisse.

ESPERIENZA DI CONTROLLO, 29 aprile 1907. — Un ratto bianco viene infettato di virus di strada sotto cute.

Risultato. — L'animale presenta paralisi il 12 maggio, ore 7 ant. e muore il 13 maggio, ore 7 pom.

Conclusioni. — *a*) La sostanza nervosa normale di tacchino salvò 2:3 degli animali. *b*) La sostanza nervosa normale di rana ne salvò 1:6; gli altri cinque morirono per causa ignota, probabilmente di intossicazione. *c*) La sostanza nervosa di pollo fu la meno attiva delle tre sostanze, inquantochè tutti gli animali morirono di rabbia.

Riassunto dei risultati ottenuti.

Dalle numerose esperienze istituite su 538 animali risultò quanto segue:

1° La sostanza nervosa normale di agnello salvò il 97.7 % dei ratti infettati di virus di strada sotto cute, mentre la sostanza nervosa rabica ne salvò l'88 % (1).

2° L'emulsione di testicoli (pure ricchi di lecitina) provata per confronto si è mostrata sprovvista di qualsiasi potere immunizzante,

(1) Onde confrontar meglio i risultati si fecero sempre le percentuali anche se calcolate sopra uno scarso numero di animali.

perchè i ratti, infettati di virus di strada sotto cute, morirono nella proporzione del 100 %.

3° La sostanza nervosa normale di agnello all'1: 10-20-40,000 salvò il 71 % dei ratti infettati di virus di strada sotto cute. Nelle stesse diluizioni la sostanza rabica ne salvò il 77 %.

La sostanza nervosa normale e rabica fortemente diluite perdono alquanto del loro potere immunizzante ma non in grado proporzionale. Infatti, mentre la diluizione della sostanza nervosa normale al 10 % salvò il 100 % dei ratti e nella diluizione al 5 % salvò l'86% od anche l'80 %, ne salvò invece solo il 71 % diluita all'1: 10-40,000. La sostanza nervosa rabica mentre al 10% salvò l'88%, all'1: 10-40,000 salvò il 77 % dei ratti.

4° La sostanza nervosa normale disseccata in alcune esperienze salvò solo il 10 % dei ratti infettati sotto cute di virus di strada, mentre la sostanza nervosa rabica ne salvò il 70 %.

In altre esperienze peraltro, mentre la sostanza nervosa rabica ne salvò pure il 70 %, la sostanza nervosa normale ne salvò l'80 %.

Riunendo poi i risultati delle prime e delle seconde esperienze, risulterebbe che la sostanza nervosa normale salvò il 45 % degli animali e la sostanza nervosa rabica ne salvò il 70 %.

5° La sostanza nervosa normale fresca di agnello salvò l'86.6 % dei ratti infettati sotto cute di virus di strada. Il vaccino Pasteur invece ne salvò solo il 70 %.

6° La sostanza nervosa sia normale che rabica riscaldata a 100° ed anche a 75° non salvò alcuno dei ratti e topolini infettati di virus di strada sotto cute.

7° La sostanza nervosa normale trattata con succo gastrico naturale salvò il 100 % dei ratti infettati di virus di strada sotto cute. La sostanza nervosa rabica invece, trattata pure con succo gastrico, ne salvò solo l'80 %.

Con succo gastrico artificiale le due sostanze, normale e rabica, salvarono entrambe l'80 % dei ratti.

8° La sostanza nervosa normale e rabica, somministrate per ingestione, salvarono entrambe il 100 % dei topolini contro la susseguente infezione di virus di strada.

9° La sostanza nervosa normale introdotta per via rettale salvò il 25 % dei ratti contro la susseguente infezione di virus di strada; la sostanza nervosa rabica ne salvò il 33 % od anche il 60 %. Bisogna peraltro notare che la quantità di sostanza rabica somministrata fu il doppio di quella normale.

10° Il siero di cani trattato con emulsione fenicata di sostanza

nervosa sia normale che rabica salvò il 100 % dei topolini infettati di virus fisso sotto cute.

11° Il siero di cani immunizzati con sostanza nervosa sia normale che rabica non salvò alcuno dei topolini infettati di virus fisso se iniettato dopo 84-72 ore; ne salvò il 33 % se iniettato dopo 48 ore e il 50 % se iniettato dopo 24 ore.

12° Lo stesso siero di cani immunizzati con sostanza nervosa sia normale che rabica salvò il 100 % dei topolini infettati di virus di strada anche se iniettato dopo 6-8 giorni. Coi ratti il risultato fu incerto.

13° Il siero di conigli immunizzati con sostanza nervosa fresca sia normale che rabica salvò il 66 % dei topolini infettati 6-8 giorni prima di virus di strada.

Il siero di conigli immunizzati con sostanza nervosa disseccata normale non salvò alcuno degli animali; il siero di conigli trattati con sostanza nervosa rabica pure disseccata salvò solo il 33 % dei topolini. Queste esperienze verranno ripetute su un numero di animali maggiore.

14° La mescolanza di virus fisso e di siero di conigli, immunizzati con sostanza nervosa sia normale che rabica, salvò il 100 % dei ratti infettati di virus fisso, iniettata anche 8 giorni dopo.

15° Il siero di cani immunizzati con sostanza nervosa normale fu, come il siero di cani immunizzati con sostanza nervosa rabica, capace di neutralizzare il virus fisso *in vitro*.

16° La sostanza nervosa normale di tacchino fu molto più attiva di quella di pollo imperocchè mentre quella di tacchino salvò il 66 % degli animali, quella di pollo non ne salvò nessuno. La sostanza nervosa normale di rana è di un'azione immunizzante quasi nulla, come quella di pollo. Questa fu anche molto tossica inquantochè 5 : 6 degli animali morirono non di rabbia prima del tempo.

Conclusione generale.

Dai risultati suesposti si conclude quindi che quasi nessuna differenza si è potuta trovare nel potere immunizzante della sostanza nervosa normale e di quella nervosa rabbica, sia che si immunizzassero gli animali con le due sostanze nella concentrazione del 5-10 %, oppure in forte diluizione, cioè dall'1 : 1000 all'1 : 40,000, sia che se ne alterasse il potere immunizzante sottoponendole alla temperatura di 100° od anche solo a 75° per 30-15 secondi, od all'azione del succo gastrico, sia che venissero somministrate per ingestione tali e quali, oppure che venissero trattate con agenti chimici (acido cloridrico

3 : 1000), sia che venissero iniettate per la via endo-rettale, sia che si confrontasse variamente e ripetutamente il potere immunizzante del siero degli animali trattati colle medesime, oppure il potere neutralizzante dello stesso siero sul virus rabbico *in vitro*.

Una marcata differenza in favore della sostanza nervosa rabbica si sarebbe trovata attenuando il potere immunizzante delle due sostanze mediante il disseccamento col metodo Pasteur (sulla potassa, per tre soli giorni, temperatura 18°-20°). In altra serie di ricerche, peraltro, questo risultato venne completamente contradetto e si ebbe anzi una leggiera superiorità nel potere immunizzante della sostanza nervosa normale.

Il disseccamento diminuisce costantemente il potere immunizzante della sostanza nervosa rabbica: difatti, mentre la medesima allo stato fresco (mio vaccino) salvò il 100 % degli animali, disseccata, invece, sulla potassa per soli 3 giorni a 18° circa, ne salvò, come si disse, soltanto il 70 per cento.

Quindi il disseccamento nella preparazione del vaccino antirabbico è assolutamente da abolire sostituendo il vaccino Pasteur con un vaccino preparato con virus fisso sterilizzato mediante un antisettico (acido fenico 0.5-1 %).

Secondo le esperienze da me istituite sino ad ora risulta infine che il potere immunizzante contro la rabbia nei muridi, della sostanza nervosa normale fresca di agnello, non è inferiore al vaccino Pasteur.

E' certo che il potere immunizzante contro la rabbia varia secondo la specie di animali da cui proviene. Infatti ebbi già occasione di dimostrare altrove marcate differenze tra la sostanza nervosa di rana e di pollo, con quella di cane, coniglio e tacchino. Quindi nei confronti dei vari vaccini è necessario paragonare sempre la sostanza nervosa della stessa specie di animale.

Vi è differenza tra la sostanza nervosa dei vari animali, così al sostanza nervosa di agnello è di molto superiore a quella di pollo e di rana, che hanno dato risultati nulli. Risultati discreti invece li ha dati la sostanza nervosa di tacchino.

Metschnikoff, Courmont e Doyon trovarono qualche cosa di simile riguardo alla tossina tetanica: secondo questi autori infatti il potere antitossico della sostanza cerebrale di rana e di pollo è molto inferiore al potere antitossico di quella di cavallo, di cavia, ecc.

L'ordine poi, riguardo al potere immunizzante delle varie sostanze nervose normali esperimentate, sarebbe, riservandomi a confermarlo con ulteriori ricerche, il seguente: ratto, coniglio, agnello, bue, cane, tacchino, rana, pollo.

Istituto d'Igiene della R. Università di Cagliari

Casi di intossicazioni alimentari da "B. faecalis alcaligenes,,

per i dottori L. TRINCAS, assistente, e G. OLLA, allievo interno.

Non ostante le conoscenze sempre più progredite, acquisitesi sulle intossicazioni alimentari, tendano a non giustificare in modo assoluto la distinzione che finora si è fatta di queste in *gastro-enteriti infettive e botulismo*, pur tuttavia essa viene ancora mantenuta e seguìta dalla quasi totalità degli osservatori che s'occupano di tale ordine di ricerche, pur risultando da queste che per la complessità dei sintomi e per la svariata etiologia delle due forme di intossicazioni, l'una si confonde coll'altra in moltissimi casi, onde sarebbe, in base a un insieme di considerazioni, più logico e appropriato riunirle sotto l'unica denominazione di *intossicazioni o avvelenamenti alimentari*.

Ad ogni modo, stando alla distinzione suddetta, oggidì si comprendono sotto la denominazione di *gastro-enteriti infettive* quei casi nei quali prevale, quale quadro sintomatologico saliente, l'alterazione più o meno grave del tubo gastro-enterico, che talvolta assume il carattere di un semplice imbarazzo gastrico o di una lieve enterite, tal'altra presenta fenomeni imponentissimi con vomito, diarrea profusa, febbre alta, fino a simulare il carattere di forme tifose o coleriche; mentre sotto la denominazione di *botulismo* si comprendono quei casi nei quali passano in seconda linea i fatti morbosi da parte del tubo gastro-enterico, mentre predominano quegli a carico del sistema nervoso, con paralisi dei muscoli oculari e degli arti, ptosi, midriasi, spesso anuria e stitichezza: la febbre manca affatto, anzi, specie nei casi acutissimi si ha vera e propria temperatura di collasso, l'individuo cade in coma e la morte chiude il quadro del processo morboso.

Circa il reperto anatomo-patologico nelle forme di gastro-enterite infettiva predominerebbero le alterazioni più o meno gravi della mucosa del tubo gastro-enterico, colle note caratteristiche di un processo infiammatorio (arrossamento, iperemia, chiazze emorragiche sparse qua e là, follicoli solitari e placche del Peyer notevolmente tumefatte); nel botulismo invece si riscontrerebbero prevalenti le alterazioni delle cellule nervose con cromatolisi, sino al completo disfacimento della cellula nervosa stessa.

Circa l'etiologia, le gastro-enteriti infettive si ritengono sostenute da un gruppo di germi affini al B. del tifo e al B. del colon.

Dacchè nel 1888 il Gärtner (1) dimostrò la natura infettiva di numerosi casi di avvelenamento per carne, nei quali potè costantemente isolare un germe, da lui denominato *B. enteritidis*, la letteratura andò man mano arricchendosi di lavori, dei quali alcuni portarono alla conferma assoluta del reperto di Gärtner e ad una più esatta specializzazione del *B. enteritidis* stesso ed altri portarono all'isolamento di germi, da ascriversi al gruppo di forme che in sistematica batterica occupano un posto tra il B. di Eberth e quello di Escherich.

Così diversi autori poterono dimostrare la stretta analogia tra il B. di Gärtner e i paratifi; e certi altri avanzarono l'ipotesi che il B. di Gärtner non fosse altro che il B. paratifo capace di produrre malattie a carattere tossico come l'avvelenamento da carne e malattie a carattere infettivo come la febbre tifoide.

I principali sostenitori di questa teoria sono lo Schottmüller e il Trautmann, che proposero di chiamare il germe di Gärtner, B. paratifico.

Chi si occupò di un accurato studio sistematico comparativo del *B. enteritidis* e dei paratifi fu il De Nobele.

Questi, nelle sue ricerche basate in special modo sulla reazione agglutinante, potè innanzi tutto distinguere il B. di Gärtner stesso in due tipi:

1°) *tipo enterite*, comprendente il *B. enteritidis* propriamente detto ed altri germi affini, isolati successivamente da diversi autori;

2°) *tipo Aerthrych*, comprendente un germe isolato dall'autore ad Aerthrych, ed altri identici studiati da altri osservatori.

Stando ai risultati delle osservazioni del De Nobele, i germi appartenenti al tipo *Aerthrych* sarebbero i più affini al B. paratifico *B*.

Il Rocchi (2) con ricerche recentissime condotte con scrupolosa esattezza e basate su prove sierodiagnostiche confermò l'asserzione degli autori, che ammettono i tipi di B. Gärtner: « enteritidis » ed « Aertrych » e l'impossibile differenziazione dei germi appartenenti a quest'ultimo tipo col B. paratifo *B*, col B. della pneumoenterite dei suini tipo « Smith », col B. itteroide, col B. psittacosi e col B. del tifo dei topi.

Ma anche altri germi di non minore importanza, pure appartenenti allo stesso gruppo, sarebbero stati in questi ultimi tempi incolpati quali agenti causali di dette intossicazioni alimentari e precisamente germi appartenenti al gruppo dell'*Hog-Cholera*, grande famiglia microbica che, come si sa, sta a fianco del B. di Eberth e di quello di Escherich.

Un tale reperto avrebbe avuto di recente il Gardenghi, il quale in casi di avvelenamento da carne, avrebbe isolato diversi microrganismi e tra essi uno che secondo l'A. non differiva dal *B. suipertifer*.

Certo tale reperto ha bisogno di ulteriori conferme per poter escludere in modo assoluto il dubbio, che i germi isolati in caso di avvelenamento alimentare e ascritti al gruppo dell'Hog-Cholera, altro non siano che lo

---

(1) Per la letteratura dell'etiologia delle varie intossicazioni alimentari è molto utile l'elaborata rivista che di essa ne fa il Rocchi nel Bull. scienze mediche 1906, Serie VIII, Vol. VI.

(2) Bull. scienze mediche. Bologna, 1907. Serie VIII, vol. VII.

stesso *B. di Gärtner*; e ciò è necessario a farsi, giacchè trattandosi di un gruppo di batteri, causa di malattie infettive frequenti nei comuni animali da macello, si capisce quale parte importante essi potrebbero avere nell'etiologia degli avvelenamenti alimentari nell'uomo.

Comunque, in base a questi studi, si può affermare che la gastro-enterite infettiva da intossicazioni alimentari, se dal lato clinico può essere considerata come una entità morbosa a sè, dal lato etiologico invece può essere distinta in diversi tipi, dacchè svariati germi, sebbene affini l'uno all'altro, possono provocarla: tipo *Eberth*, *Gärtner*, *Schottmüller*, *Hog-Cholera*, etc.

Circa l'etiologia del botulismo, dimostrata nel 1895 dal Van Ermengem essere sostenuta da un germe da lui chiamato *B. botulinus*, altre ricerche poterono stabilire che non solo il *B. botulinus*, ma anche altri germi del tutto diversi possono dar luogo a processi morbosi in tutto identici a quelli causati dal germe di Van Ermengem. Così, come causa del botulismo si è incolpato il *B. del colon*, si sono descritti vari Protei (*proteus vulgaris*, *proteus varians*); un germe affine al *B. coli*, il *B. celluloformans* dell'Amburger, e persino lo stafilococco piogeno aureo, il *B. del carbonchio* e il *B. piocianeo*.

Oltre a ciò, Lustig, Zardo, Galeotti e Carini, hanno isolato, in caso di intossicazione alimentare verificatisi in seguito alla ingestione di murici, di ricci, di pidocchio di mare, ecc., dei germi non ancora bene definiti.

Tali reperti ci indicano che il concetto di botulismo non va, come si è fatto sinora, limitato a quello di una infezione dovuta a un bacillo specifico, il *B. botulinus*, potendo essere provocato, come si vede, dai più svariati germi appartenenti a gruppi del tutto diversi, e che inoltre il botulismo non va ristretto nella cerchia dei soli avvelenamenti da carne, giacchè può verificarsi dietro l'ingestione delle più diverse sostanze alimentari.

***

I casi di intossicazione alimentare, oggetto delle nostre osservazioni, si riferiscono ad un avvelenamento per formaggio, la cui prima origine pare debba attribuirsi ad inquinamento del latte (1), dacchè il latte stesso provocò, ingerito, gli stessi fatti morbosi che seguirono all'ingestione del formaggio.

Riferiamo, senz'altro, i casi clinici.

G. S., di Cagliari, d'anni 7 mangiò del formaggio il giorno 29 marzo 1907: alle 20 e mezza. Alle 23 e mezza accusò vivissimi dolori alla regione epigastrica. Era estremamente pallido nel volto e freddo nelle estremità. Seguirono diverse scariche di vomito, perdita della coscienza, estrema prostrazione. La temperatura si abbassò sotto il limite fisiologico.

---

(1) Sembra anche che la pecora che fornì il latte avesse le mammelle ammalate: noi però non l'abbiamo potuto accertare, dacchè quando uno di noi si recò sul posto essa era già morta e non fu possibile sapere dove fosse andato a finire il cadavere.

Dopo vari giorni, con un intervento medicamentoso adeguato, si ebbe il completo ristabilirsi dell'individuo.

E. S., di Cagliari, d'anni 4 e mesi 6, fratello del precedente. Mangiò, contemporaneamente al fratello, del formaggio, e, presso a poco nel medesimo intervallo di tempo, ebbe a soffrire gli stessi sintomi, tra cui predominanti le scariche di vomito, l'estremo pallore e il raffreddamento del corpo, dolori alla regione epigastrica; mancante la diarrea. Anche in questo caso, con una cura sintomatica l'individuo si potè gradatamente ristabilire, pur rimanendo per alcuni giorni con assoluta inappetenza e con una generale stanchezza del corpo.

M. C., d'anni 18, da Maracalagonis, serva in casa dei precedenti. Mangiò dello stesso formaggio. Dopo varie ore comparve il vomito, che si ripetè varie volte, costituito da una sostanza semiliquida giallo-brunastra, amara. Al vomito si accompagnò anche una diarrea profusa, che durò per tutto il giorno dopo. Anche qui gli stessi dolori acutissimi alla regione epigastrica, prostrazione di tutto il corpo, notevole pallore del volto, la temperatura più bassa del normale.

L. Z., fu Salvatore, di Cagliari. Mangiò lo stesso formaggio. Dopo alcun tempo comparvero i sintomi che in nulla differivano da quelli presentati dagli altri infermi.

S. F., pastore, bevette del latte che servì per la preparazione del formaggio suddetto.

Dopo varie ore comparvero dei disturbi intestinali con gli stessi dolori epigastrici, i vomiti cogli stessi caratteri, diarrea, grave prostrazione del corpo, forte abbassamento della temperatura.

***

Il formaggio non presentava alcun carattere appariscente macroscopico da cui si potesse dedurre la sua alterazione: colore, odore, sapore e consistenza normali: negativa la presenza di metalli tossici.

Dopo varie ricerche preliminari riuscimmo ad isolare un germe che non solo inoculato per via sottocutanea si mostrava eminentemente patogeno per i comuni animali da esperimento, ma anche somministrato per via gastrica si dimostrava capace di determinare in essi un quadro sintomatologico, che, sia nelle linee generali che nelle particolari, si poteva in tutto riportare a quello riscontrato nelle infezioni spontanee.

Le ricerche su questo germe furono condotte scrupolosamente e non solo dal punto di vista batteriologico, ma anche dal punto di vista biochimico, per vedere se fosse possibile trovare una qualche affinità coi germi finora descritti quali agenti causali delle intossicazioni alimentari.

Riferiamo i risultati delle ricerche fatte, iniziando lo studio coll'esame dei caratteri microscopici dell'accennato germe.

Caratteri microscopici. — Prelevando il materiale da una coltura in agar a becco di flauto, di 24 ore di sviluppo e colorando colla fucsina carbolica, si riscontra il germe di forma ovale, corto, tozzo, colorato più agli estremi che al centro, con le estremità arrotondate; colorando col bleu di metilene si riscontra anche più colorato agli estremi che al centro, di forma ovale ad estremità arrotondate, però appare meno corto e largo che colorato colla fucsina carbolica.

La forma particolare del germe spicca ancora di più colorandolo col liquido di Nicolle: anche in questo caso il germe si presenta corto e tozzo, di forma ovale, più colorato ai poli che al centro.

Prelevando il materiale da colture su patate si riscontrano delle forme batteriche, che in un primo tempo, cioè dopo 24 ore di sviluppo della coltura, si riportano per i loro caratteri a quelle descritte per le colture in agar: in seguito però tendono sempre ad allungarsi, cosicchè dopo 4-5 giorni nei preparati colorati colla fucsina carbolica si notano prevalenti le forme a bastoncino, lunghe e sottili, e delle quali alcune colorate uniformemente, altre interrottamente: qua e là poi diverse forme a filamenti che si fanno più numerose nell'ulteriore sviluppo della coltura.

Prelevando il materiale da coltura in brodo di vari giorni di sviluppo e colorando sia colla fucsina carbolica, sia col bleu di metilene in soluzione idroalcoolica, si hanno prevalenti le forme corte e tozze, colorate più ai poli che al centro; scarse le forme a bastoncino, colorate interrottamente, mancanti le forme filamentose. Delle forme a bastoncino alcune sono isolate, altre disposte in serie così da ricordare delle vere e proprie catene bacillari.

Col metodo del Gram il germe resta colorato.

Col bleu di Loeffler non si mettono in evidenza in esso dei granuli metacromatici; lo stesso risultato negativo si ha col liquido del Giemsa (Grübler) e col metodo del Neisser.

Col metodo di Ziehl-Neelsen il germe prende il colore di contrasto, anche se si ricava da colture in latte, di vari giorni.

Col metodo di Moeller per la colorazione delle spore si constata l'assoluta mancanza di esse.

Esaminato in goccia pendente il germe presenta uno spiccato ed attivo movimento a serpentino, attraversando ciascuna forma, con grandissima rapidità, il campo del microscopio.

A 35°-37° lo sviluppo del batterio si presenta rigoglioso, già dopo 18 ore dall'innesto; lo sviluppo si ha anche discreto a una temperatura di 20°-24°.

Caratteri colturali. — In *gelatina a piatto* il germe dà luogo a due specie di colonie: grandi e piccole; microscopicamente le colonie grandi si dimostrano sottilissime, biancastre, a contenuto finamente granuloso, con un nucleo centrale tendente al giallastro, senza strati concentrici nè venature e a bordi generalmente regolari: le piccole, giallastre, a forma meno regolare delle grandi, ovali e rotondeggianti, a contenuto finamente granuloso.

L'insieme della piastra, specie ai bordi, assume dopo vari giorni di sviluppo, una caratteristica fluorescenza verdastra.

Nell'*agar a piatto* si osservano le colonie con gli stessi caratteri di quelle in gelatina: anche nell'agar si ha lo sviluppo di colonie grandi e

piccole con lo stesso aspetto microscopico di quelle in gelatina: dopo 10-12 giorni l'aspetto delle colonie ricorda quello di tante goccie di rugiada.

In *agar a becco di clarino* già dopo 18 ore dall'innesto il germe si sviluppa dando luogo a una patina bianco-sporca, umida, vischiosa: in seguito questa assume un colorito giallastro tendente al verde, specie a luce diffusa, in un primo tempo, e poi si fa di un colore nettamente giallo melato che finisce per diffondersi in tutto lo spessore del substrato.

I bordi della patina dapprima ondulati, si fanno in proseguo di tempo raggiati.

L'acqua di condensazione è notevolmente torbida; alla superficie si forma una pellicola spessa, difficilmente distruggibile e risalente in alto, lungo le pareti del tubo.

In qualche coltura, specie quando essa dati da un certo tempo (7-8 giorni), tanto alla superficie dell'agar quanto nel suo spessore si ha la formazione di caratteristici cristalli aghiformi, ramificati.

In *gelatina per infissione* si ha lungo la linea di innesto lo sviluppo di un nastrino senza alcun carattere particolore e senza che la gelatina venga fluidificata.

Anche nell'*agar per infissione* il germe dà luogo a un nastrino simile; nel contempo, alla superficie dell'agar, si sviluppa una pellicola spessa, di colore giallo melato, che si diffonde in tutto il cilindro dell'agar.

Il *brodo* viene uniformemente intorbidato con formazione in superficie di una pellicola spessa che risale notevolmente sulle pareti del tubo e di abbondante sedimento mucoso al fondo della provetta. Il brodo non assume alcuno speciale colorito; la sua reazione diventa sempre più alcalina e già dopo 24 ore prende una particolare consistenza mucosa e filante.

Dopo 48 ore, flutando la coltura si rivela un evidente odore putrido.

Su *patata* il batterio in discorso dà luogo ad una patina spessa, lucida, untuosa, dapprima di un colorito tendente al rossiccio, poi si demarca nettamente un colorito giallo melato. Attorno alla patina batterica la patata assume un colorito grigio nerastro.

Caratteri biologici. — Il *latte* non viene coagulato, la sua reazione diviene gradatamente sempre più alcalina.

L'innesto in speciali substrati di nutrizione non dà luogo ad alcun reperto che possa interessare.

Così, nel *terreno del Drigalski* si hanno delle colonie azzurre e nell'agar al *rosso neutro secondo Rothberger* non si ha la formazione di gas nè di fluorescenza.

L'innesto del germe in *pappa d'amido*, determina una spiccata scomposizione di questo con la produzione di abbondante quantità di glucosio; l'innesto in brodi con *saccarosio* non determina alcuna inversione dello zucchero.

Lo studio fatto sulla proprietà del germe di produrre la fermentazione di altri idrati di carbonio, quali il *glucosio*, il *lattosio*, il *maltosio*, la *glicerina* e la *mannite*, aggiunti al brodo nutritivo nelle proporzioni del 2 %, portò alla conclusione che nessuno degli accennati idrati di carbonio viene scomposto; la reazione del mezzo anzichè divenire acida (come sarebbe avvenuto se il germe avesse avuto potere fermentativo su detti idrati di carbonio) si fa invece progressivamente sempre più alcalina.

L'innesto in brodo contenente del *nitrato di soda* al 2 % dà luogo alla riduzione del sale in nitrito, rilevabile col metodo del Griess.

Le colture in *brodo caffeinato*, allo scopo di vedere se il germe desse luogo a delle forme eteromorfe, diedero, in questo caso, risultato affatto negativo, giacchè il germe in questo substrato mantenne immutata la sua forma tipica.

Reazione del triptofano. — Fatta agire dell'acqua di cloro in varie brodocolture del germe, si ebbe sempre al punto di contatto tra il brodo e l'acqua di cloro un anello rosso-viola, il quale, come si sa, viene riferito alla formazione di un composto della serie aromatica.

Reazione rossa di Voges e Proskauer. — Abbiamo voluto saggiare tale reazione sul germe in istudio tanto più che essa è stata ritenuta specifica per germi isolati in casi di avvelenamenti alimentari e precisamente per il *B. suipestifer*.

Le brodocolture trattate colla potassa secondo il metodo di Voges e Proskauer mantennero immutato il loro colore.

Azione patogena. — La prima ricerca sul potere patogeno del germe l'abbiamo diretta a vedere se il germe era capace di provocare negli animali da esperimento una affezione che si potesse riportare a quella verificatasi spontaneamente nell'uomo.

All'uopo, per metterci nelle condizioni più naturali di esperimento, veniva innestato un litro di latte a reazione antofera, non previamente scremato nè sterilizzato e tenuto per vari giorni in termostato alla temperatura di 35°-36°.

Il latte dopo 10-12 giorni assumeva una reazione debolmente acida, un colorito tendente al rossiccio, si coagulava in massa, con formazione di numerosissime bollicine di gas, specie al fondo del recipiente, ed emanava un caratteristico odore di formaggio ricotto assai penetrante.

Siccome il cane su cui sperimentavamo, nonostante si fosse mantenuto a digiuno per 24 ore per lo scopo, non mangiò spontaneamente che una piccolissima parte del latte, si fu costretti ad introdurgli il rimanente mercè una sonda gastrica.

Dopo varie ore da questa somministrazione il cane andò soggetto a violenti vomiti, che si ripeterono incessanti per circa 15 minuti, dopo i quali essi si fecero meno frequenti, finchè scomparvero completamente.

Il malessere del cane però divenne spiccatissimo: egli si presentava abbattuto, prostrato, quasi sonnolento, a stento si reggeva in piedi, tutto tremante, gli occhi semichiusi, si lamentava, e ciò che più colpiva era una spiccata contrazione del diaframma, per cui il ventre si dilatava notevolmente e a brevi intervalli.

La temperatura del cane scese sotto il limite normale, con raffreddamento di tutto il corpo, specie dell'estremità.

I disturbi generali si mantennero immutati per circa due giorni, durante i quali il cane si rifiutò in modo assoluto di prender cibo.

Ripetuto l'esperimento con latte sterilizzato innestato col germe, si riebbero gli stessi fenomeni.

Tale esperienza dimostra che il germe coltivato nel latte era capace di provocare nei cani, somministrato per via gastrica, una sintomatologia clinica del tutto identica a quella osservata nei casi di infezione spontanea nell'uomo.

Il fatto poi dell'insorgenza rapida dei sintomi morbosi e, cioè, subito dopo la somministrazione del latte innestato, ci parve dimostrare che i fatti della intossicazione fossero dovuti, più che al germe per sè stesso, a prodotti tossici formatisi nella sostanza alimentare, facilmente assorbibili.

Stabiliti questi fatti, cercammo di precisare le lesioni anatomo-patologiche, cui il germe dava luogo nei piccoli animali da laboratorio, a seconda delle diverse vie per cui veniva inoculato.

Per lo scopo ci servimmo delle cavie, che inoculammo sottocute, in peritoneo e nelle vene con 5 cc. di emulsione di una patina di coltura in agar di 48 ore, in NaCl al 0.85 %.

I risultati, qualunque fosse la via di inoculazione, furono press'a poco identici; ne riferiremo uno, a dire il vero, il più tipico, osservato in una cavia inoculata nel peritoneo.

23 aprile 1907. Cavia n. 35, peso gr.3 20. Riceve in peritoneo 5 cc. di emulsione in soluzione fisiologica di patina batterica di coltura in agar di 48 ore di sviluppo.

25 aprile 1907. La cavia viene a morte, presentando, all'autopsia, un edema gelatinoso sottocutaneo, specie nel punto della iniezione: il tessuto cellulare sottocutaneo sparso qua e là di tante chiazze emorragiche; il peritoneo fortemente iniettato di sangue; nel cavo peritoneale discreta quantità di un liquido siero-sanguinolento; milza alquanto più voluminosa del normale; i reni assai congesti; parimenti i polmoni, con abbondante quantità di liquido siero-sanguinolento nel cavo pleurale; il sangue del cuore rossastro e liquido. L'innesto del sangue nei comuni substrati rimase perfettamente sterile.

Occorreva intanto vedere se il germe nell'esplicare la sua azione patogena producesse anche dei veleni, ciò che era da sospettarsi, dai fatti anatomo-patologici osservati nelle cavie.

All'uopo venivano allestite in grosso delle brodocolture, lasciate in termostato a 35°-37° e dopo vari giorni (4-5) filtrate attraverso le Berkefeld W.

Il filtrato venne dapprima, in determinate quantità, inoculato per diverse vie nelle cavie, e poi, in seguito, solo per la via endovenosa, dacchè dalle prime ricerche fatte risultava che per la via sottocutanea e anche per la via endoperitoneale vari cc. di filtrato si dimostravano innocui, mentre per la via endovenosa si mostrava dotato di azione tossica anche in piccola quantità.

Riferiamo uno degli esperimenti, tra i più interessanti, dal quale si ricava che bastarono 8 cmc. di filtrato per uccidere l'animale in breve tempo con un quadro anatomo-patologico salientissimo.

8 maggio 1907. Cavia n. 79, peso gr. 930. Riceve nella giugulare 8 cmc. di filtrato di brodocoltura di 4 giorni.

La cavia muore dopo varie ore dalla inoculazione, presentando all'autopsia un quadro che nelle sue linee generali poteva riportarsi a quello verificatosi dietro la inoculazione diretta del batterio: iniezione, cioè, del tessuto cellulare sottocutaneo, con qua e là delle emorragie puntiformi: anche il peritoneo fortemente iperemico con abbondantissimo versamento peritoneale siero-emorragico, i testicoli notevolmente ingrossati con la vaginale assai arrossata: la milza alquanto ingrossata e un certo stato congestizio di tutti gli altri organi.

Adunque, nei substrati di nutrizione liquidi il germe produce una sostanza tossica, separabile con la filtrazione, la quale, inoculata nelle vene, uccide le cavie in poche ore, col quadro tipico di una vera e propria tossiemia.

Data l'esistenza di un veleno nei filtrati delle brodocolture, cercammo di precipitarlo col solfato di ammonio e coll'alcool per ottenerlo secco e inocularne quantità ponderabili.

Preparate in grande delle brodocolture, queste venivano, come al solito, filtrate attraverso le Berkefeld W, dopo 5 giorni di dimora in termostato.

Parte del filtrato veniva precipitato col solfato di ammonio, che veniva aggiunto in soluzione satura, indi tolto per dialisi; parte veniva precipitato coll'alcool.

Il precipitato nell'uno e nell'altro caso, raccolto in un filtro, veniva in una capsula Petri essiccato in un essiccatore a cloruro di calcio, indi finamente triturato in un mortaio, ridotto in poltiglia omogenea, ripreso con soluzione fisiologica di cloruro sodico e saggiato circa la sua azione tossica nelle cavie.

Ecco due esperienze dimostrative:

23 maggio 1907. Cavia n. 24, peso gr. 940. Riceve nella giugulare 8 mmgr. di tossina precipitata col solfato di ammonio, sospesa in 5 cmc. di Na Cl al 0.85 % sterile.

La cavia muore poco tempo dopo l'inoculazione, presentando in un primo tempo paralisi del treno posteriore, indi paralisi della vescica, con svuotamento completo di essa. All'autopsia si riscontrano tutte le note caratteristiche di una vera e propria tossiemia: il sangue è fluido e nerastro.

11 giugno 1907. Cavia n. 52, peso gr. 390. Riceve nelle vene una dose press'a poco eguale di tossina precipitata coll'alcool. La cavia subito dopo l'inoculazione presenta un spiccato malessere: è prostrata, rifiuta il cibo e dentro 24 ore viene a morte, e mostra l'accennato reperto anatomopatologico.

Adunque, il batterio, nelle brodocolture produce una sostanza tossica solubile, separabile mercè la filtrazione e precipitabile tanto coll'alcool che col solfato di ammonio: essa spiega la sua azione specialmente se inoculata nelle vene.

Abbiamo allora sottoposta questa sostanza all'azione di alcuni agenti fisici per stabilirne la resistenza.

Sgraziatamente queste ricerche sono poche, perchè non si sono potute continuare.

Intanto però s'è potuto assodare che essa, sottoposta all'azione del calore umido a 70°-75° per un'ora, ugualmente si mostrò tossica inoculata in una cavia, la quale morì presentando il noto quadro anatomopatologico.

***

Stabiliti così tutti i caratteri più salienti (morfologici, colturali, biologici e biochimici) del germe, per adire ad una esatta identificazione di esso non si poteva tralasciare di procedere a delle ricerche siero-agglutinanti, specie rispetto ad altri germi coi quali si poteva dubitare potesse avere dei rapporti di analogia.

E diciamo subito, già *a priori*, che, solo in base agli accennati caratteri del germe si potè escludere alcuna affinità col *B. botulinus* del Van Ermengem, germe, come si sa, strettamente anaerobio e sporigeno.

In base a questi stessi caratteri, fu poi facile togliere il dubbio che il germe potesse appartenere al gruppo dei *Protei*, come a tutta prima poteva sembrare, giacchè, a parte le altre differenze, la presenza della capsula che caratterizza i *Protei*, e la resistenza al metodo del Gram di questi, almeno per i due tipi, cui si fanno appartenere i *Protei* stessi, rendevano possibile una netta distinzione.

Adunque, non rimaneva altro che applicare le prove comparative siero-diagnostiche al caso di germi, con i quali esso mostrasse avere una maggiore affinità, e precisamente con quegli appartenenti al gruppo del B. del tifo e del B. del colon, compresi i due paratifi *A* e *B*, il *B. enteritidis* di Gärtner e il *B.* dell'*Hog-Cholera*.

Si praticò così il saggio del siero di sangue di animali trattati col germe in istudio, sul gruppo dei germi ricordati, e quello del siero di sangue di animali trattati con questi ultimi, sul primo.

Senza riferire con un qualche dettaglio l'una e l'altra serie di queste prove, per amor di brevità, diremo solo che in nessun caso, neanche con diluizioni di siero molto deboli, si riuscì a rivelare la benchè minima attività reciproca dei sieri accennati, rispetto alla reazione agglutinante.

E quindi, se in base ai dati morfologici, biologici e colturali era possibile stabilire qualche punto di contatto tra il germe in esame e il gruppo del B. del tifo, *B. coli*, *paratifi*, *B. enteritidis* del Gärtner, *B.* dell'*Hog-Cholera*, detti punti di contatto perdevano valore in base al reperto negativo della reazione siero-agglutinante, cui, secondo le vedute moderne, si deve annettere grande importanza, non solo per

la diagnosi di specie, ma anche per quella di gruppo dei batteri, specialmente in considerazione del così detto fenomeno di *coagglutinazione o agglutinazione di gruppo.*

Eliminato così il dubbio, che il germe in istudio potesse ascriversi a uno qualunque dei gruppi di batteri isolati dai vari osservatori, in casi di intossicazione alimentare e prendendo in un accurato esame tutte le sue proprietà, fu possibile (specie in base alla proprietà costante di dare in tutti i substrati liquidi delle sostanze alcaline, in modo da mutarne profondamente la reazione) riavvicinarlo al gruppo del *B. faecalis alcaligenes*, col quale ben presto ci accorgemmo avere identici tutti gli altri caratteri.

***

Sulla importanza del gruppo del *B. faecalis alcaligenes* dal punto di vista della patologia, poco si sa.

Ritrovato spesso nelle deiezioni di ammalati che erano affetti da tifo addominale o che erano sospetti di esserlo, le prime notizie di esso non risalgono che al 1889, e sono del Petruschky, il quale però non ne fece la descrizione che nel 1896.

Pochissimi altri lavori seguirono alle osservazioni del Petruschky. Alcuni autori, come l'Altschüller e il Doebert, sarebbero riusciti a dimostrare la possibilità di trasformare colture di *B. faecalis alcaligenes* in tipiche colture del B. del tifo, ammettendo così una perfetta equivalenza tra questi due batteri.

Tale reperto però fu confutato da altri sperimentatori, avendo questi, come il Berghaus, potuto provare che le colture con le quali avevano lavorato i due accennati autori non erano pure, ma inquinate.

Sebbene limitate e discordanti, queste ricerche ebbero il merito di avere precisato che realmente il gruppo *B. faecalis alcaligenes* esiste come gruppo a sè e indipendente finchè le recenti ricerche eseguite da Klimenko (1) su 22 rappresentanti del gruppo, procuratisi da diversi laboratori e istituti, condussero l'autore a stabilire una classificazione di questi vari stipiti in due gruppi, e questi alla loro volta in diversi sottogruppi.

Certo, però, la classificazione del Klimenko non ci pare per diverse considerazioni completamente esatta (basterebbe il solo fatto della proprietà di produrre o no del pigmento, elevato dall'autore a criterio fondamentale di classificazione, per diminuire ad essa la sua impor-

---

(1) *Die Gruppe des Bac. faecalis alcaligenes* (Centralbl. f. Bakt. Bd. XLIII. Heft. 8).

tanza scientifica): certo, grande è la confusione che regna ancora nel gruppo, e abbisognano ulteriori studi perchè si possa attribuirgli un posto sistematico bene caratterizzato e definito.

E a mettere sempre più in rilievo questo asserto stanno i risultati ultimamente comparsi delle ricerche del Rocchi (1) che tenderebbero a riannodare il *B. faecalis alcaligenes* da un lato a quello del paratifo B., e dall'altro ad alcuni dei tipi, nei quali in questi ultimi tempi si è distinto il gruppo dell'*Hog-Cholera* e più specialmente a quello del B. « Preisz ».

Se intanto, per fissare maggiormente i vari caratteri del nostro germe, si volesse, pur attenendoci alla classificazione del Klimenko attribuirgli un qualche posto, esso si dovrebbe collocare tra il primo e il secondo dei due gruppi costituiti dal Klimenko, e cioè tra quello i cui stipiti hanno la capacità di produrre pigmento, e quello i cui stipiti o non possiedono affatto questa proprietà o la possiedono in modo assai limitato, giacchè esso si è dimostrato avere dei caratteri dell'uno e dell'altro.

Resta la quistione della poco o nulla patogenicità del gruppo, ammessa anche dal Klimenko, il quale non riscontrò alcuno degli stipiti da lui studiati, patogeno nè per le cavie, nè per i sorci, nè per i ratti bianchi.

Tale quistione però perde ogni importanza qualora si pensi, che detto germe perde facilmente di passaggio in passaggio nei substrati di nutrizione artificiali, come noi abbiamo avuto campo di constatare, le sue proprietà patogene, e perchè tutto dà a credere che gli autori che si occuparono di tali ricerche, abbiano sperimentato con degli stipiti in queste condizioni di attenuazione.

Con ulteriori ricerche ci studieremo di stabilire se appunto in base a tali considerazioni, il *B. faecalis alcaligenes* che ha perduto ogni sua azione patogena, possa riacquistarla, se fatto sviluppare in sostanze atte all'alimentazione, nonchè se evvi qualche rapporto tra la produzione di pigmento e la tossicità del germe; se cioè, col diminuire la prima, diminuisse anche la seconda, perchè le condizioni che influiscono sulla produzione del pigmento influiscano anche sulla produzione delle tossine.

Ci è nato questo dubbio in base a quanto noi stessi abbiamo potuto constatare che la perdita della tossicità del germe coincideva appunto col momento in cui visibilmente era di gran lunga diminuita nel germe la facoltà di produrre pigmento nei substrati di nutrizione.

---

(1) Loc. cit.

Istituto d'Igiene della R. Università di Cagliari

Sul conferimento dell'immunità anti-vaccinale con pus vaccinico filtrato attraverso le Berkefeld W, introdotto per la via endovenosa e sottocutanea

per il prof. O. CASAGRANDI.

La quistione dell'immunizzazione degli animali e dell'uomo verso l'infezione vaccinica a mezzo dei filtrati di vaccino, sicuramente privi di qualunque batterio coltivabile e visibile, stata da me presa in esame con risultati non perfettamente uguali per i cani e per l'uomo, ho cercato quest'anno di completare per la parte che si riferisce agli animali, istituendo nuove ricerche sui medesimi.

Dirò subito che tre punti, interessanti l'uno la tecnica da seguire per mettermi nella condizione di ottenere un filtrato immunizzante; il secondo per accertarmi dell'attività del filtrato vaccinico; il terzo per fissare i dati onde assicurarmi della conseguita immunità antivaccinale, fermarono prima di ogni altro la mia attenzione.

Riguardo alla tecnica, ho già fatto più volte rilevare che, perchè si possa ottenere un filtrato vaccinico che dia garanzia di contenere il virus vaccinico, è necessario che il vaccino sia molto bene triturato prima, e convenientemente diluito dopo per poter filtrarlo: triturazione che si ottiene nel modo migliore e più sicuro accuratamente pestando la polpa vaccinica in mortai, in presenza di quarzo.

Io mi servo di questo procedimento: da prima trituro in un mortaio di porcellana a superficie rugosa, il materiale, aggiungendo qualche goccia di NaCl al 0.85%, e poi la poltiglia, che deve essere molto densa, la passo a porzioncine in un mortaio di agata dove continuo la triturazione sino a che nulla sento più stridere sotto il pestello; infine la passo, dopo averla diluita in una conveniente quantità di soluzione di NaCl sterile, in un mortaio di acciaio a grosso pestello, il quale può girare intorno al proprio asse con movimento meccanico. In questo mortaio continuo la triturazione sino a che il materiale ha assunto un colorito grigio oscuro

per la presenza di finissime particelle di acciaio. Lavo quindi il mortaio e il pestello in soluzione fisiologica e filtro, facendo in modo che un tubetto di ordinario vaccino del commercio, venga a esser sospeso in 100-150 cmc. di NaCl al 0.85% (1).

Il passaggio nel mortaio di acciaio, ho finito col reputarlo di importanza fondamentale dacchè soltanto dopo questo passaggio sono sicuro di ottenere il materiale, sempre convenientemente diluito, capace di passare attivo attraverso le Berkefeld W, le Chamberland F e persino B, facendo durare la filtrazione un tempo brevissimo, pochi minuti, e aiutandola con il fare una buona aspirazione (fino ad un'atmosfera di pressione negativa) nel recipiente di raccolta del liquido.

Tutte le altre tecniche lasciano a desiderare di fronte a questa: la macerazione in acqua salata, od in acqua distillata, la semplice triturazione più o meno prolungata nei comuni mortai di porcellana od agata, ecc., non raggiungono lo scopo di ottenere un filtrato sempre attivo attraverso le Berkefeld W, e le Chamberland F, a meno di non far durare troppo a lungo la filtrazione: sono però spesso atte a ottenere un filtrato attivo attraverso le Berkefeld W ed N, come hanno, dopo di me, osservato altri autori.

Sui quali filtrati ottenuti attraverso queste due specie di candele V ed N, come ho più volte insistito e torno a farlo ora, non è il caso di fondarsi per giudicare della filtrabilità del virus vaccinico, come di qualunque altro virus dacchè queste candele lasciano passare con troppa facilità anche batteri visibili e coltivabili.

E qui è il caso si aggiunga ancora che neppur vale, per giudicare della sterilità di un filtrato vaccinico, fondarsi sulla sterilità dei terreni di coltura comuni innestati con il filtrato stesso, giacchè i germi passati attraverso le candele possono essere pochissimi, non capitare nelle poche goccie o anche in quei cmc. di filtrato che sono innestati nei terreni colturali.

Filtrati assolutamente sterili nei comuni terreni di cultura, li ho trovati ricchi di forme coccacee, dopo averli lasciati incubare nei tamburelli di collodion altrove già descritti di mia costruzione, posti nel cavo peritoneale di conigli. Del resto ricerche eseguite per altro lavoro, aggiungendo ai liquidi da filtrare materiali adatti allo sviluppo dei batteri, mi hanno permesso di trovare anche i filtrati ottenuti attraverso alcune Berkefeld W, inquinati con una forma a bastoncino molto piccola: è questo ciò che mi è occorso filtrando lo sputo dei pertossici contenente il *B. pertussis* dell'Iochmann, che ho potuto così assodare passi anche attraverso alcune Berkefeld W.

Persuaso, perciò, in riguardo alla filtrabilità del virus vaccinico, della nessuna importanza delle esperienze con virus filtrato attraverso le Berkefeld V ed N, dopo avere bene triturata e diluita la polpa vaccinica,

---

(1) Naturalmente, non ho creduto di servirmi volta per volta di quantità ponderata di polpa vaccinica, non solo per le difficoltà materiali per raggiungere l'intento di pesare il vaccino del commercio, ma anche perchè tutto il lavoro presente riguarda un insieme di esperienze di orientamento sull'immunizzazione degli animali coi filtrati. Mi son quindi sempre riferito al contenuto di un ordinario tubetto di vaccino del commercio come unità di misura, salvo poi a studiare il modo di dosare esattamente la quantità di polpa vaccinica, per gli ulteriori esperimenti, che dopo l'esito di quelli riferiti nel presente lavoro, ho intenzione di eseguire.

l'ho filtrata attraverso le Berkefeld W e non mi sono servito del filtrato se non dopo avere acquistata la sicura garanzia della sua sterilità, ossia dopo averlo fatto incubare nel peritoneo dei conigli entro tamburelli di collodion per 4-6 giorni e non semplicemente innestandoli nei comuni terreni di cultura.

Circa il modo di accertarmi dell'attività del filtrato le mie ricerche eseguite coi filtrati, ottenuti nel modo sopra ricordato, mi hanno condotto a conclusioni che non collimano con quelle di vari autori, dacchè non posso convenire in questi due fatti: che un vaccino debba ritenersi attivo solo quando scarificato sulla cute dell'uomo e degli animali recettivi produce la pustolosi cutanea o solo quando inoculato nella cornea dei conigli produce il fenomeno guarneriano.

Riguardo alla *pustolosi cutanea* che, per primo affermai non essere la lesione che sta a dimostrare la acquisita immunità vaccinale, oramai anche altri autori ritengono non debba avere tale significato: citerò il Kraus e il Volkmann. Ma anche senza ricorrere alla autorità altrui, ripeterò qui che i due fatti fondamentali che mi condussero a non riconoscergli tale importanza furono e sono sempre questi: il non aver mai potuto osservare la pustolosi vaccinale senza isolare dal contenuto della pustola lo stafilo cocco aureo anche quando questa pustolosi l'ottenevo con vaccini filtrati attraverso le Berkefeld W e successivamente depurati coi vapori di cloroformio; l'avere ottenuto nei cani l'immunità antivaccinale scarificandone la cute dell'addome con vaccini filtrati i quali non solo non producevano pustole ma neppure papule sulla cute stessa.

Quanto al fenomeno guarneriano nella cornea dei conigli, sebbene le ricerche che si fanno nel mio laboratorio non possano ritenersi esaurienti e non mi abbiano potuto trarre ad una conclusione decisiva su questo particolare e interessante fenomeno, tuttavia il fatto di avere ottenuti dei filtrati che scarificati sulla cute dei cani, l'immunizzavano verso l'infezione vaccinica cutanea e non producevano il fenomeno microscopico noto, mi lasciò perplesso nel ricorrere a tale prova per giudicare dell'attività del vaccino filtrato.

A questo quando io aggiunga l'altro dato, della possibilità di ottenere il fenomeno guarneriano microscopico con vaccini di varia età i quali non solo non sono più capaci di produrre una pustolosi cutanea sulle braccia dei bambini, ma non li immunizzano neppure verso una seconda vaccinazione con pus vaccinico attivo, è facile comprendere perchè, per giudicare dell'attività del filtrato vaccinico, in queste esperienze di immunizzazione, non credetti opportuno di ricorrere neanche all'innesto corneale.

Ricorsi invece alla rivaccinazione cutanea con vaccino non filtrato attivo. Gli animali cioè, venivano scarificati sulla cute con il filtrato vaccinico e, sia che il filtrato producesse pustolosi cutanea, sia non producesse alcuna lesione, a guarigione della lesione stessa (fosse anche solo quella prodotta dallo strumento scarificatore) venivano innestati ancora sulla cute, nello stesso modo, con del vaccino attivo non filtrato.

Se nessuna lesione si determinava nel corso di due settimane, il filtrato vaccinico si giudicava attivo e veniva adoperato per gli esperimenti: quando invece, in seguito alla rivaccinazione con pus vaccinico, si produceva sia pure anche una sola papula o una pustola in uno qualunque dei punti rivaccinati o in qualsiasi altra parte della cute, il vaccino filtrato, si giudicava inattivo e non si adoperava per gli esperimenti di immunizzazione.

Come dettaglio di tecnica faccio notare che per dar tempo a che le diverse prove sui filtrati, dessero garanzia di sperimentare con un filtrato nelle condizioni richieste dall'esperimento, a conti fatti ciascun filtrato, spesso, veniva ad essere adoperato 20 o 25 giorni dopo che si era ottenuto, nel qual tempo, come ho potuto più volte assicurarmi, il virus non subiva alcuna modificazione nella sua attività, sempre che il recipiente che conteneva il filtrato fosse tenuto all'oscuro o al coperto da ogni causa d'inquinamento.

Per giudicare dell'attività del vaccino occorreva ancora far la *scelta della specie dell'animale* su cui sperimentare l'attività immunizzante del filtrato.

Non v'ha dubbio che dalle ricerche da me eseguite volta a volta sui cani e sui conigli, cui ne aggiunsi nuove sui gatti, gli animali che si mostrarono più adatti rimasero sempre i giovani cani. Certo i conigli giovani si prestano anche essi, ma meno bene dei cani: nei conigli, per ottenersi la pustolosi vaccinica, è necessario che il vaccino sia molto attivo; i vaccini mediocremente attivi non producono alcuna pustola. Non così nei cani. I gatti purchè piccoli si comportano come i cani reagendo a vaccini anche mediocremente attivi: solo la pustolosi è meno rigogliosa. Come animali da esperimento ho quindi preferito i cani e mi sono servito dei gatti solo quando non ho potuto avere a disposizione mia cani in numero sufficiente.

Infine, legata ancora con l'attività del filtrato restava la *scelta del vaccino*. L'esperienza portandomi ad ammettere un diverso comportamento dei vaccini di diversa provenienza, mi sono servito costantemente dello stesso vaccino bovino del Vaccinogeno di Pavia fornitomi dalla cortesia dell'ufficiale sanitario di Cagliari, dott. L. Brotzu. Accanto ad esso ho solo eseguito alcune esperienze con lo stesso vaccino passato nei cani e nei gatti.

Riguardo infine ai dati su cui fondarmi per precisare l'avvenuta immunità antivaccinale negli animali, riflettendo che se avessi dovuto ricorrere senz'altro all'innesto cutaneo di polpa vaccinica non filtrata e giudicare della acquisita immunità dalla non comparsa di pustole nei punti scarificati, mi sarei posto nelle condizioni di non poter più continuare il trattamento degli animali in cui si produceva la pustolosi, ho ricorso ad altri procedimenti prima di quello ora ricordato e precisamente alla prova del Bordet.

Al riguardo farò prima di ogni altra cosa notare che le prove istituite col siero degli animali — cani — vaccinati sulla cute con vaccino attivo non filtrato, sono costantemente riuscite negative. I cani che reagirono positivamente alla inoculazione di polpa vaccinica attiva sulla cute, con una tipica pustolosi, anche se si dimostrarono rispondere negativamente ad una seconda ed una terza rivaccinazione praticata a distanza di una settimana a tre mesi dalla prima, mostrarono il loro siero incapace di deviare il complemento normale di cavia: i corpuscoli rossi di capra sensibilizzati aggiunti al miscuglio, fatto in diverse proporzioni, di siero di cane vaccinato posto per mezz'ora a 56° e di siero di cavia fresco e di vaccino vennero sempre emolizzati.

Non ostante queste prove negative, che, per quanto mi consta, altri ha osservato di recente nei bovini, ho insistito sulla prova atteso il sospetto che detti risultati negativi potessero dipendere da condizioni tecniche, di triturazione del vaccino, del veicolo del virus vaccinico, ecc. Sostituii perciò vaccino lavato, sopra candele di porcellana porosa, con soluzioni di NaCl al 0.85 % senza triturarlo, vaccino ugualmente trattato e poi accuratamente triturato in un mortaio e infine vaccino triturato e filtrato, secondo la tecnica più sopra descritta attraverso le Berkefeld W, nonchè vaccino triturato e diluito in acqua distillata, poi filtrato attraverso le stesse candele e concentrato a un decimo, riducendo il liquido con opportuna aggiunta di NaCl a soluzione fisiologica al 0.85 %.

Usando detti vaccini, continuando i risultati a mantenersi invariabilmente negativi, gli esperimenti stavano così a dimostrare che *nè il veicolo nè le condizioni di triturazione nè la presenza di altro materiale nel pus vaccinico*, oltre il virus, potevano essere la causa della negatività dei risultati, come d'altro canto non poteva esserlo la poca quantità di virus aggiunta al miscuglio dei sieri, giacchè non mancai di eseguire delle prove con quantità di virus notevole (a tutto il contenuto di un ordinario tubetto di pus vaccinico aggiunsi un decimo di cmc. di siero di cane vaccinato posto per mezz'ora a 56°, più un decimo di siero di cava normale, più 2 goccie, di sospensione in NaCl al 0.85 %, di corpuscoli rossi di capra sensibilizzati con siero di coniglio trattato con sangue di capra).

Col cadere così del sospetto che la negatività degli esperimenti fosse dovuta alla tecnica, restavano in campo due ipotesi: o che il metodo del Bordet non fosse adatto a mettere in evidenza, nei cani vaccinati per la via cutanea, sensibilizzatrici libere in circolo per il virus vaccinico o che con la vaccinazione cutanea non si ottenesse nei cani una immunità generale verso l'infezione vaccinica.

Lasciando per un momento da parte la prima possibilità, ho considerato la seconda. Nelle eventualità, infatti, che per la via cutanea il virus non producesse una immunità generale bisognava vedere se introdotto per altre vie ugualmente si comportasse.

A tal'uopo senza procedere a tentativi di immunizzazione, introducendo il virus per tutte le porte d'entrata che si usano nel laboratorio, ho

eseguita una esperienza introducendo il virus per la via endovenosa. E poichè nulla impediva che mi avvalessi del fatto da me acquisito della presenza del virus nei filtrati ottenuti anche attraverso le Berkefeld W, invece di servirmi di vaccino non filtrato, sia pure accuratamente triturato e magari centrifugato, per privarlo della parte più grossolana (dacchè il vaccino del commercio che contiene troppi materiali eterogenei oltre il virus) procedetti senz'altro ad inoculazioni endovenose di ottimo filtrato di vaccino ottenuto attraverso le Berkefeld W. Qui intanto è il caso di rilevare come alcuni esperimenti eseguiti in precedenza, e che ho già pubblicati, di inoculazione endovenosa di detti filtrati nei cani, mi avessero condotto a risultati completamente negativi, circa la immunizzazione dei medesimi animali, inoculati però una sola volta o anche due e poi successivamente scarificati sulla cute con vaccino attivo non filtrato: i cani presentarono sempre la nota pustolosi cutanea. Però in proseguo avendo inoculato nelle vene per 4 o 5 volte del filtrato vaccinico rispettivamente a due cani e successivamente rivaccinati gli animali con pus vaccinico non filtrato e avendo ottenuta una pustolosi poco rigogliosa e neppure estesa a tutti i punti scarificati, m'indussi nella persuasione che ripetendo un maggior numero di volte l'inoculazione del filtrato si potesse eottenre negli animali l'immunità cutanea antivaccinale.

L'esperimento fu eseguito in doppio: l'uno da me e l'altro dal mio assistente volontario dott. Zedda.

Io eseguii 10 iniezioni endovenose in un cane del peso di Kg. 6.500, ognuna di 50 cmc. di filtrato alla distanza di 7 giorni l'una dall'altra consumando in tutto 500 cmc. di vaccino filtrato, pari a quattro tubetti di ordinaria polpa vaccinica del commercio. Prima di fare la quinta e la settima inoculazione e dopo 12 giorni dalla ultima, estrassi un poco di sangue dalle vene e separatone il siero con questo eseguii la prova del Bordet. Per la quale mi servii sia di vaccino non filtrato ma molto bene triturato e lavato su candela e sospeso in soluzione di NaCl al 0.85 % (un tubetto in 10 cmc. di NaCl al 0.85 %) sia di filtrato vaccinico ottenuto attraverso le Berkefeld W, diluito in acqua distillata, concentrato ad un decimo e aggiunto di cloruro sodico fino a farne la nota soluzione fisiologica, sia ancora del vaccino filtrato così come si ottiene nelle ordinarie condizioni cioè diluito in NaCl al 0.85 % non concentrato.

Il Zedda eseguì un esperimento analogo, soltanto che si servì di una quantità in complesso minore di vaccino filtrato, eseguì saltuariamente le iniezioni e in ogni iniezione non adoperò le stesse quantità di vaccino filtrato.

I risultati furono, si può dire, concordi e se vogliamo, positivi; sebbene col siero del cane trattato dallo Zedda, l'emolisi non sia del tutto mancata. Anche nell'esperimento eseguito col siero del cane da me trattato, ad ogni modo, l'emolisi mancò nei tubi in cui venne aggiunto il vaccino triturato lavato e non filtrato o quello diluito in acqua distillata concentrato ridotto a soluzione fisiologica: si presentò invece là dove venne adoperato il vaccino filtrato diluito con solu-

zione fisiologica di cloruro sodico non concentrato, ciò che a me para stia a dimostrare semplicemente, come per la positività della prova abbia notevole importanza la quantità del virus che viene aggiunto ai miscugli dei sieri.

Nei suoi dettagli principali la prova procedette come segue: in tutti i tubi in cui venne aggiunto da $^{1}/_{0}$ di cmc. di siero di cano trattato riscaldato a 56°, più siero di cavia normale ($^{1}/_{10}$ di cmc.) più 1 cmc. di vaccino triturato e non filtrato o 2 cmc. di vaccino filtrato e concentrato, più 2 gocce di sospensione in NaCl al 0.85 % di corpuscoli rossi di capra sensibilizzati con siero di coniglio trattato con sangue di capra, la emolisi non avvenne. Questo finchè venne adoperato il siero del cane da me trattato. Quando invece venne usato per la prova il siero del cane trattato dal Zedda, l'emolisi si mostrò appena appariscente soltanto in vicinanza ella cupola.

Riuscita così positiva la prova del Bordet per poter dare ad essa l'importanza di dato su cui fondarsi per giudicare dell'acquisita immunità nei cani, bisognava ora vedere se i cani così trattati si mostrassero immuni anche verso l'innesto cutaneo di vaccino non filtrato.

A tal uopo i due cani vennero innestati sulla cute con vaccino attivo naturalmente non filtrato: in nessuno dei due animali non solo ebbe a svilupparsi alcuna pustola (gli animali vennero tenuti in assidua osservazione per 69 giorni) ma neppure si sviluppò lesione alcuna che mettesse in sospetto sulla produzione di una qualsiasi efflorescenza vaccinica.

***

Nessun dubbio quindi più esistendo *sulla possibilità di giudicare della avvenuta immunità antivaccinica per mezzo dell'inoculazione endovenosa di filtrato vaccinico ottenuto attraverso la Berkefeld W, colla prova del Bordet*, ho creduto oramai aver precisati tutti i dati tecnici necessari per accingermi a prove sistematiche di immunizzazione antivaccinica coi filtrati vaccinici ottenuti attraverso le Berkefeld W, assolutamente privi di qualsiasi germe coltivabile o dimostrabile, all'infuori del virus vaccinico.

Questi dati, per maggiore chiarezza, come risulta dal fin qui detto, sarebbero i seguenti:

1. Che i filtrati siano ottenuti attraverso le Berkefeld W e non attraverso le altre candele V ed N.

2. Che detti filtrati siano rimasti sterili nei sacchetti di collodion, tenuti nel cavo peritoneale dei conigli per 4-6 giorni e non siano dichiarati sterili in seguito al risultato negativo del solo innesto nei comuni substrati colturali.

3. Che essi immunizzino i cani contro l'infezione vaccinica cutanea prodotta dalla rinoculazione sulla cute degli animali trattati, di vaccino attivo non filtrato.

4. Che la prova dell'attività dei filtrati sia eseguita sui cani giovani o sui giovani gatti e non sui conigli, che sono meno sensibili all'infezione vaccinica cutanea.

5. Che l'attività del vaccino filtrato, venga giudicata non dalla produzione di una pustolosi cutanea o da quella del fenomeno guarneriano nella cornea, ma dall'esito negativo della rivaccinazione cutanea con vaccino non filtrato attivo.

6. Che a giudicare della acquisita immunità antivaccinale, prima di ricorrere alla inoculazione cutanea di vaccino attivo, venga praticata la ricerca di sensibilizzatrici specifiche antivacciniche nel siero degli animali, secondo il metodo del Bordet, servendosi di vaccino ben triturato lavato e non filtrato o di filtrato vaccinico concentrato.

***

Assodati tutti questi fatti dirò subito che gli esperimenti sistematici li ho condotti in modo da rispondere coi maggiori dettagli possibili al quesito: *se coll'inoculazione di filtrati ottenuti nel modo anzidetto, inoculati per diverse vie da quella cutanea, si potesse ottenere l'immunità negli animali e nel caso affermativo, quali fossero le condizioni di tecnica necessarie per raggiungere lo scopo.*

Le vie principali da scegliere sarebbero state la sottocutanea, l'endovenosa, l'endoperitoneale, la gastrica, la tracheale.

Di queste tre vie ho dovuto per il momento lasciare da parte le ultime due, perchè in alcuni animali cui venne (in alcuni esperimenti eseguiti dal mio assistente vol. dott. Zedda) somministrato filtrato per la via gastrica e per la via tracheale e che morirono, mi è avvenuto all'autopsia di riscontrare nelle mucose, delle lesioni che mi han fatto nascere il sospetto di vere e proprie localizzazioni del virus: del pari, negli animali inoculati per la via endoperitoneale, due dei quali morirono nel corso degli esperimenti ed uno ucciso a bella posta, nel peritoneo parietale ed in qualche punto anche del viscerale, ho notato delle lesioni che mi hanno fatto nascere lo stesso sospetto. Inoculando sotto cute e nelle vene i filtrati nessuno di questi fatti mi è occorso di osservare nè nel luogo di inoculazione del sottocutaneo nè nelle vene inoculate (negli animali che vennero a morte nel corso degli esperimenti e in due che a bella posta sacrificai) come pure in nessun altro organo (1).

---

(1) Mi riservo però di riprendere questi esperimenti introducendo il virus per le altre porte d'entrata e di precisare con esami microscopici se la inoculazione dei filtrati per la via sottocutanea e per quella endovenosa realmente non producano alcuna lesione che stia a dimostrare localizzazione del virus.

Ad ogni modo nella possibilità che nell'introdurre l'ago nel sottocutaneo o nelle vene, del virus fuoriescisse dalla siringa e determinasse sulla cute circostante una qualsiasi lesione (come qualche volta mi è accaduto di osservare) per cui mi vedessi costretto a interrompere l'esperimento d'immunizzazzione, ho sempre adoperato delle siringhe ad ago smontabile, ho introdotto, nel fare le inoculazioni sottocutanee, l'ago ripieno di olio di vasellina sterile e dopo averlo estratto ho avuto gran cura di praticare una buona disinfezione della parte lesa, con sublimato corrosivo.

Gli esperimenti vennero eseguiti con filtrato di vaccino bovino, canino e felino.

Gli esperimenti con vaccino bovino furono diretti a stabilire da un canto la quantità di vaccino filtrato da inocularsi nelle vene, necessaria per mettere in evidenza sensibilizzatrici specifiche antivacciniche in circolo, e dall'altro a precisare se a parità di condizioni di esperimento ugualmente si comportassero gli animali di fronte ai fenomeni immunitari, quando l'introduzione del virus fosse eseguita per la via sottocutanea.

Gli esperimenti con gli altri vaccini, che per brevità ho chiamato canino e felino, furono eseguiti per vedere se i filtrati di vaccino bovino di passaggio in altre specie di animali, continuassero a godere delle stesse proprietà ed in ugual grado o in grado diverso di quello bovino passato in animali della stessa specie.

I. — Immunizzazione coi filtrati inoculati per la via endovenosa.

Prima serie di esperimenti.

Inoculazione per la via endovenosa di vaccino filtrato in quantità progressivamente crescente di 10 in 10 cmc. ogni settimana.

Riferisco in dettaglio un esperimento (l'ultimo in ordine di data, il più completo come esperimento) dei cinque eseguiti, facendo notare che di due di essi non ho potuto fare alcun conto, perchè l'uno dopo la terza inoculazione, l'altro dopo la quinta andarono perduti: in ambedue gli animali sulla cute nella piegatura dell'inguine si formarono alcune pustoline che potevano benissimo essere localizzazioni del virus.

Esperimento. *21 aprile 1907.* — Da un tubetto di vaccino Pavia, si preleva con lancetta una traccia di materiale e la si scarifica sulla cute dell'addome rasa di un giovanissimo gatto allo scopo di saggiare l'attività del vaccino. Il resto si tritura e si diluisce in 100 cmc. di NaCl al 0.85 % e si filtra in 3 minuti attraverso un'ottima Berkefeld W. Il filtrato si

porta con aggiunta di nuova soluzione fisiologica al volume di 150 cmc.; 2 cmc. di filtrato si prelevano e si chiudono in un tamburello di collodion sterile che s'introduce nel cavo peritoneale di un coniglio; 1 cmc. si semina a parte in brodo e in agar.

27 aprile 1907. — Si osservano due pustole sulla cute dell'addome del gatto nei due punti scarificati ciò che sta ad indicare che il vaccino è attivo. Il tamburello di collodion estratto dal cavo peritoneale del coniglio è ripieno di un liquido limpido, privo, all'esame microscopico, di qualsiasi germe; l'agar e il brodo risultano sterili: il vaccino può quindi ritenersi privo di germi visibili e coltivabili. Si divide allora in 4 recipienti l'uno contenente 10 cmc. di filtrato, l'altro 20, il terzo 30 e il quarto 40 (1).

Ciò fatto, si pratica una inoculazione nella giugulare sinistra di 10 cmc. di filtrato.

14 maggio. — Idem di 20 cmc.

21 maggio. — Idem di 30 cmc. Prima di procedere alla inoculazione del filtrato si estraggono 5 cmc. di sangue dalla giugulare stessa e si procede, dopo separato il siero, alla prova del Bordet.

22 maggio. — La prova del Bordet è riuscita completamente negativa. In questo stesso giorno si procede alla triturazione di altri 5 tubetti di vaccino Pavia e alla loro filtrazione: il filtrato s'innesta in due tamburelli di collodion che si pongono nel cavo peritoneale di un grosso coniglio e si fanno innesti in brodo e in agar di 2 cmc. di filtrato, nonchè alcune scarificazioni sulla cute dell'addome raso di un piccolo cane.

28 maggio. — S'innesta sulla cute del cane precedente, vaccino attivo non filtrato per saggiare l'attività immunizzante del nuovo filtrato. Si estraggono i tamburelli di collodion dal cavo peritoneale del coniglio e si trovano sterili; del pari sterili si dimostrano i substrati colturali innestati.

29 maggio. — Si inoculano nella giugulare destra altri 40 cmc. del primo filtrato, al cane sottoposto al trattamento immunizzante.

5 giugno. — Il cane innestato sulla cute con vaccino attivo non filtrato non ha presentato alcuna lesione: si può quindi ritenere che il filtrato vaccinico, col quale era stato vaccinato in precedenza, si trovi nelle condizioni adatte per usarlo per le ulteriori inoculazioni. Si divide perciò in diverse porzioni: di 50, 60, 70, 80, 90, 100 ecc. cmc. ciascuna. Si pratica

---

(1) Per fare questa separazione in modo che il liquido non venisse in contatto con l'ambiente esterno e potesse inquinarsi, faccio notare, che il recipiente di raccolta dei filtrati, ho opportunamente scelto a fondo imbutiforme con rubinetto, sul tipo dei comuni estrattori, in modo da potere introdurre il collo del recipiente in uno dei divisori dei distillati usati in chimica, i quali permettono, girando opportunamente una tubulatura interna, di dirigere il getto del liquido in un foro piuttosto che in un altro e così farlo pervenire a volontà in diversi recipienti. Naturalmente prima di procedere alla separazione del liquido il divisore veniva innestato al recipiente di raccolta del filtrato già sterilizzato nella stufa a vapore fluente. Anche i recipienti in cui veniva a essere suddiviso il filtrato erano innestati antecedentemente al divisore sterilizzati: tali innesti venivano fatti per mezzo di ovatta sterile. Ancora, appena riempiti i recipienti, questi venivano distaccati e chiusi con batuffoli di ovatta sterilizzata.

quindi una inoculazione nel cane di 50 cmc. di questo secondo filtrato nella giugulare destra.

12 giugno. — Prima di procedere ad una nuova inoculazione dalla femorale sinistra, si estraggono 5 cmc. di sangue e separatone il siero si fa la prova del Bordet. Essendosi proceduto nella mattina al salasso nella medesima giornata, si può avere il responso della prova. *Si trova emolisi solo in vicinanza della cupola.*

Appena fatta l'estrazione del sangue si è intanto proceduto alla inoculazione di altri 60 cmc. del secondo filtrato.

19 giugno. — Nella stessa vena si inoculano 70 cmc. del filtrato.

21 giugno. — Nella femorale destra si inoculano altri 80 cmc.

27 giugno. — Si inoculano altri 90 cmc. nella stessa vena.

3 luglio. — Si estraggono alcuni cmc. di sangue dalla stessa vena giugulare destra e si procede alla prova del Bordet. Intanto si inoculano 100 cmc. di filtrato.

4 luglio. — La prova del Bordet si avvicina ad esser positiva: l'emolisi è appena percettibile al di sopra della cupola.

10 luglio. — Si inoculano nella giugulare sinistra 110 cmc. di filtrato con che si sono venuti ad inoculare nell'animale cmc. 660.

14 luglio. — Si salassa l'animale ancora dalla giugulare destra e si procede alla prova del Bordet.

15 luglio. — La prova riesce completamente positiva: nessuna traccia di emolisi in alcun tubo.

Rasa la cute dell'addome si praticano 12 scarificazioni e in ciascun punto scarificato si depone del vaccino attivo non filtrato. Contemporaneamente con lo stesso vaccino si praticano innesti cutanei sulla cute di un giovane gatto.

23 luglio. — Sulla cute del gatto si osserva lo sviluppo di una rigogliosa pustolosi, indizio dell'attività del vaccino: sulla cute del cane nessuna traccia di lesione. Il cane, dal 16 luglio fu osservato giornalmente e mai presentò alcun fatto che potesse far pensare ad un attecchimento del virus.

31 luglio. — Il cane tenuto in osservazione non ha presentato fino a tutt'oggi nulla che fermi l'attenzione sulla cute dell'addome: si può quindi ritenere completamente immunizzato anche verso l'infezione vaccinica cutanea.

Questi esperimenti conducono a ritenere *che è possibile immunizzare i cani verso il vaccino con inoculazioni nelle vene, di polpa vaccinica filtrata attraverso le Berkefeld W, ripetute e in dose progressivamente crescente, praticate di settimana in settimana, usando in complesso una quantità di polpa vaccinica pari a circa 5 tubetti di ordinario vaccino del commercio diluito in poco meno di 700 cmc. di liquido.*

SECONDA SERIE D'ESPERIMENTI (1).

Inoculazione di vaccino filtrato per la via endovenosa introducendo in 2 e 5 volte la stessa quantità di filtrato che immunizza i cani inoculati progressivamente di 10 in 10 cmc. nelle vene.

L'esperimento fu eseguito in due cani, i quali vennero inoculati l'uno nelle vene con 150 cmc. per 5 volte ripetendo l'inoculazione ogni 7 giorni, l'altro con 700 cmc. in due volte sempre alla distanza di 7 giorni l'una inoculazione dall'altra.

Senza entrare in dettagli, dirò semplicemente che, dopo la quinta inoculazione, indubbiamente nel siero del cane trattato 5 volte si trovavano delle sensibilizzatrici specifiche libere, perchè la prova del Bordet si può dire riuscisse in parte positiva: l'emolisi si osservava infatti soltanto in vicinanza della cupola. Nel siero del cane trattato due volte l'emolisi invece era del tutto negativa e tale si mantenne anche dopo 14 giorni dall'ultima inoculazione: in quest'epoca infatti ripetuto il salasso la prova venne rifatta nel dubbio che occorresse del tempo per la produzione delle sensibilizzatrici stesse.

Questi esperimenti dimostrano che è ancora possibile ottenere delle sensibilizzatrici libere in circolo nei cani inoculando per 5 volte di seguito nelle vene di cani con una quantità di filtrato pari a quella che in complesso produce l'immunità inoculata frazionatamente in dosi via via crescenti di 10 in 10 cmc.; e, che lo stesso fatto non si ottiene inoculando la medesima dose in due sole volte.

Ma v'ha di più, ambedue questi cani inoculati sulla cute con vaccino non filtrato attivo presentarono la nota pustolosi, la quale fu però limitata e non rigogliosa nel cane inoculato 5 volte; mentre in quello inoculato due sole volte si osservò in tutti i punti scarificati: certo però le pustole erano poco rilevate e meno estese che nelle condizioni ordinarie.

TERZA SERIE D'ESPERIMENTI.

Inoculazioni endovenose di filtrato vaccinico in quantità uguale per ogni inoculazione a distanza di 7 giorni l'una dall'altra e inoculazioni, del pari endovenose, di filtrato in dose progressivamente crescenti di 10 in 10 cmc. a distanza di 2-3 giorni l'una dall'altra.

---

(1) La seconda, terza e quarta serie di esperimenti vennero eseguiti dal febbraio al giugno: nel riferirli, non si tiene conto delle date, come fu fatto per la prima serie, giacchè ciò porterebbe a una esposizione delle ricerche che non riuscirebbe dimostrativa, e quindi sarebbe fuori di luogo.

Anzitutto fu sottoposto un cane alla inoculazione di 50 cmc. di filtrato ogni settimana sino ad introdurre per la via endovenosa in questo cane 700 cmc. di filtrato pari a 6 tubetti di ordinario vaccino del commercio.

Un altro cane fu inoculato con 750 cmc. di filtrato nelle vene praticando ogni inoculazione, in dose progressivamente crescente di 10 in 10 cmc., alla distanza di 48 ore e al più 3 giorni l'una dall'altra.

Il primo cane alla fine del trattamento che durò 101 giorni presentava la prova del Bordet positiva sebbene accanto alla cupola una leggera traccia di emolisi si osservasse: in tutti i modi la vaccinazione cutanea con vaccino attivo non diede luogo che a una sola pustola in uno dei 16 punti scarificati.

Il secondo cane alla fine del trattamento (tecnicamente assai penoso) che durò 39 giorni, si dimostrò invece ancora recettivo alla infezione vaccinica: la prova del Bordet riuscì negativa; la vaccinazione cutanea con vaccino attivo non filtrato riuscì positiva: in tutti gli 8 punti scarificati si osservarono piccole pustole.

Perciò mantenendo in una quantità uguale per ogni inoculazione, i cmc. del filtrato vaccinico, pur lasciando lo stesso periodo di tempo tra una inoculazione e l'altra, non si riesce a ottenere una immunità antivaccinica così notevole come quando si sottomette l'animale alla inoculazione di dosi via via crescenti di vaccino filtrato. D'altro canto pur continuando a somministrare il filtrato in dosi via via crescenti riducendo però il periodo di riposo a due o tre giorni, non si riesce ad immunizzare i cani, pur avendo inoculato la medesima quantità di filtrato che li immunizza lasciando tra una inoculazione e l'altra una settimana di intervallo.

Quarta serie di esperimenti.

Inoculazioni endovenose di filtrato vaccinico bovino passato nei cani e nei gatti.

Sebbene questo gruppo di esperimenti non possa ritenersi completo tuttavia lo riporto, giacchè dimostra la difficoltà di ottenere gli stessi risultati raggiunti col vaccino bovino quando questo venga passato per altri animali. Mi riservo a suo tempo di completare queste ricerche le quali potranno avere importanza nella pratica per giudicare da quale animale debba provenire il vaccino per essere adatto a fornire un filtrato che si trovi nelle migliori condizioni per riuscire immunizzante.

Gli esperimenti eseguiti sono due soltanto: l'uno con vaccino canino, l'altro con vaccino felino, ambedue nei cani.

Il cane inoculato con vaccino felino allorchè la quantità di filtrato innestata raggiunse i 600 cmc. presentava già nel siero sensibilizzatrici antivaccíniche libere giacchè dopo 12 giorni dall'ultima inoculazione, l'emolisi non si osservò che al di sopra della cupola.

Il cane inoculato con vaccino felino invece non presentò dopo un identico trattamento alcuna sensibilizzatrice libera in circolo: la prova del Bordet riuscì negativa.

D'altro canto i due cani inoculati sulla cute con vaccino attivo non filtrato, appunto il dodicesimo giorno dall'ultima inoculazione, cioè nello stesso giorno in cui si praticò il salasso, non si mostrarono immuni verso l'infezione vaccinica cutanea, giacchè, dopo 9 giorni si svilupparono, nel primo cane 7 pustoline su 13 punti innestati e nel secondo 11 su 15: è ben vero però che le pustoline si mostrarono molto piccole, non tesero a confluire e dopo 5 giorni erano già sparite.

Non posso però a meno di far rilevare che il vaccino da me adoperato si trovava indubbiamente in condizioni diverse da quelle in cui si trova l'ordinario vaccino del commercio, giacchè risultava da diverse raccolte, fatte in diverse epoche dagli animali in cui veniva inoculato il vaccino bovino per saggiarne l'attività; inoltre la poltiglia non era stata tenuta a bassa temperatura ma semplicemente allo scuro a temperatura ambiente. Va aggiunto ancora che la quantità contenuta in ogni tubetto non poteva essere costantemente la stessa non essendo possibile una divisione esatta di ogni raccolta.

Ad ogni modo trattandosi di vaccino bovino passato in animali di diversa specie, l'esito degli esperimenti potendo indurre nel sospetto che *il vaccino in questi passaggi si fosse attenuato,* ho col medesimo scarificato la cute dell'addome di due giovani cani per saggiarne l'attività.

Nel cane vaccinato con vaccino canino, dopo 9 giorni si sono sviluppate rigogliose pustole in tutti i 7 punti scarificati; nel cane inoculato con vaccino felino, le pustole si sono sviluppate in 5 su 7 punti e le 5 pustole si sono indubbiamente presentate meno rigogliose.

Parrebbe quindi che almeno nel passaggio nei gatti il vaccino bovino si fosse attenuato.

II. — **Immunizzazione coi filtrati inoculati per via sottocutanea.**

Questi esperimenti, cronologicamente, sono antecedenti e contemporanei a quelli già riferiti e sono stati eseguiti oltre che sui cani anche su animali di maggiore mole.

Esperimenti sui cani.

La preparazione degli esperimenti seguì come quella riportata nel primo gruppo di esperimenti d'inoculazioni endovenose di filtrato.

Essi furono 5, dei quali ben 3 andarono perduti, giacchè non ostante tutte le cure avute, dopo un certo numero d'inoculazioni (rispettivamente dopo la seconda, la terza e la sesta) nel punto innestato si formarono ove 2, ove più pustoline.

I 2 esperimenti completi consistevano in:

1° inoculazioni nel sottocutaneo di un cane di filtrato vaccinico in quantità crescente di 20 in 20 cmc. ogni 5 giorni;

2° inoculazioni nel sottocutaneo di un cane di cmc. 20 di filtrato ogni 5 giorni mantenendo la dose costante.

I risultati furono i seguenti:

1° Nel cane inoculato ogni 5 giorni con dosi crescenti di filtrato dopo l'undicesima inoculazione, cioè dopo avergli inoculati 1320 cmc. di filtrato, la prova del Bordet riuscì completamente positiva: innestato sulla cute con vaccino bovino attivo si mostrò completamente immune.

2° Nel cane inoculato con dosi eguali di filtrato la prova del Bordet riuscì positiva dopo la quarantaquattresima inoculazione, cioè dopo avergli inoculati 880 cmc. di filtrato: innestato sulla cute con vaccino bovino attivo rispose negativamente all'infezione vaccinica.

E' chiaro quindi che i due cani trattati con l'inoculazione sottocutanea di vaccino filtrato sia somministrandone dosi progressivamente crescenti, sia mantenendo la dose allo stesso quantitativo di cmc. si immunizzarono completamente verso l'infezione vaccinica cutanea.

Stando così le cose ho eseguito un ultimo esperimento inoculando sotto cute ad un giovane cane, in una sola volta 890 cmc. di filtrato vaccinico bovino, pari a 8 tubbetti di vaccino del commercio ed ho proceduto alla prova del Bordet dopo 7, 18, 21 giorni con risultato del tutto negativo.

E' chiaro quindi, che inoculando in una sola volta sotto cute la quantità di vaccino che immunizza i cani, somministrata loro frazionatamente a intervalli di 5 giorni, non si immunizzano.

Esperimenti su altri animali.

Durante le esperienze eseguite nei cani, ho eseguite alcune altre ricerche su animali di diversa specie, di maggiore mole, e precisamente su due capre, una pecora e un asino.

Ad essi ho inoculato quantità crescenti di vaccino ove di 50 in 50 cmc., ove di 20 in 20, ove di 30 ecc., a seconda della quantità di vaccino e corrispondentemente di filtrato che possedevo.

Faccio solo notare, che non potendo sempre avere a mia disposizione vaccino bovino, ho usato anche filtrato di vaccino bovino passato nei cani e gatti, del quale ne avevo sempre più o meno a mia disposizione raccogliendolo dagli animali su cui sperimentavo l'attività dei vaccini, prima di filtrarli ecc.

Questi esperimenti in compenso sono stati condotti con molta regolarità, essendosi ripetute le inoculazioni ogni 5 giorni ed eccezionalmente ogni 6. Li riassumo nella seguente tabella :

Animale	Data dell'inoculazione	Qualità di cmc. di filtrato inoculato		Prova del Bordet — Data	Prova del Bordet — Risultato
Capra I. .	2 marzo	100	Totale cmc. 1340 pari a 11 tubetti di vaccino	..	..
	7 »	120		..	..
	12 »	130		..	..
	18 »	140		..	..
	23 »	150		24 marzo	Negativo
	28 »	160		..	..
	2 aprile	170		..	..
	8 »	180		9 aprile	Positivo
	14 »	190		15 »	Positivo
Capra II .	6 aprile	50	Totale cmc. 1460 pari a 12 tubetti di vaccino	..	..
	11 »	100		..	..
	16 »	120		..	..
	22 »	150		..	..
	27 »	200		28 aprile	Negativo
	3 maggio	220		..	..
	8 »	300		..	..
	13 »	320		14 »	Positivo
Pecora . .	2 febbraio	50	Totale cmc. 2070 pari a 15 tubetti di vaccino	..	..
	7 »	100		..	..
	12 »	150		..	..
	18 »	200		..	..
	23 »	250		..	..
	28 »	300		..	..
	5 marzo	320		6 marzo	Negativo
	11 »	340		..	..
	16 »	360		18 marzo	Positivo
Asino . . .	1 maggio	20	Totale cmc. 2550 pari a 20 tubetti di vaccino	..	..
	6 »	50		..	..
	11 »	80		..	..
	16 »	100		..	..
	21 »	150		..	..
	27 »	200		28 maggio	Negativo
	1 giugno	220		..	..
	6 »	250		..	..
	11 »	300		..	..
	17 »	320		18 giugno	Negativo
	22 »	360		..	..
	27 »	500		28 giugno	Positivo

Come si rileva dal quadro precedente è chiaro che le capre, le pecore e l'asino si immunizzarono con l' inoculazione sottocutanea di vaccino filtrato dopo un trattamento durato: poco più di un mese nelle due capre, un mese e mezzo nella pecora e quasi due mesi nell'asino, usando una quantità di filtrato di certo maggiore di quello adoperato per immunizzare i cani, ma che non può meravigliare data la circostanza che il filtrato spesso proveniva da vaccino di passaggio nei cani e nei gatti.

Ad ogni modo le sensibilizzatrici specifiche comparvero in circolo dopo la ottava inoculazione nella prima capra, dopo la settima nella seconda, dopo la nona nella pecora e dopo la dodicesima nell'asino (1).

Tutti questi animali vaccinati per la via cutanea con vaccino attivo non filtrato, rispettivamente, le due capre dopo 12 giorni dall'ultima iniezione, le due pecore dopo 10 giorni e l'asino dopo 12 giorni, non presentarono alcuna efflorescenza vaccinica per quanto ridotta sulla cute (2).

Si può quindi ritenere che al pari dei cani questi animali di grossa mole si immunizzano verso l'infezione vaccinica coll'inoculazione del filtrato vaccinico praticato sotto cute per un tempo più o meno lungo, lasciando un periodo di riposo tra una inoculazione e l'altra di 5 giorni, e, che in seguito al trattamento immunizzante compaiano in circolo delle sensibilizzatrici specifiche antivacciniche.

***

A questo punto il lavoro poteva dirsi terminato, avendo precisato nei suoi dettagli le condizioni da mettersi per ottenere l'immunità nei vari animali introducendo in circolo il filtrato vaccinico: prima però di chiudere le presenti ricerche, ho voluto saggiare se gli animali così immunizzati fornissero un siero dotato di proprietà antivacciniche.

Sarebbe prematuro che io riferissi in questo lavoro i dettagli delle esperienze sin qui eseguite, giacchè non si tratta che di prove di orientamento: con dettaglio, completandole, ne farò parola in un'altra comunicazione, la quale non può essere pronta che l'anno prossimo.

---

(1) La prova del Bordet venne anche eseguita aggiungendo corpuscoli rossi di uomo sensibilizzati con siero di coniglio trattato con sangue di uomo.

(2) Faccio notare che le pecore e le capre adulte, per quanto mi consta dalle poche prove che ho potuto fare (due), non si mostrano sensibili al l'infezione vaccinica cutanea. Non così però le pecore e le capre giovanissime che parmi si comportino sotto questo riguardo, come i cani, i quali, se adulti non sono recettivi all'infezione vaccinica, mentre giovani lo sono squisitamente. Nel caso mio, mi servii di capre e pecore giovanissime. Quanto agli asini sul momento non potei pronunziarmi sulla più o meno recettività loro all'infezione vaccinica cutanea a seconda dell'età. Tornerò del resto a suo tempo sulla recettività dei diversi animali all'infezione vaccinica, per completare la quarta serie di esperimenti, come ho già detto avanti.

Ad ogni modo non posso tacere come dei vari sieri degli animali immunizzati, cane, capra, pecora, asino, quello di capra si è dimostrato dotato di qualche proprietà preventiva verso l'infezione vaccinica cutanea, riuscendo in un giovane cane, che venne inoculato in una sola volta con 80 cmc. di siero, ad impedire che la pustolosi, provocata dalla rivaccinazione con vaccino attivo non filtrato, si presentasse così rigogliosa e diffusa come nel controllo.

Conclusioni.

Le conclusioni principali che si possono trarre dal presente lavoro sono le seguenti:

I. Col vaccino bovino del commercio filtrato, dopo opportuna triturazione e diluzione, attraverso le candele Bekefeld W, in condizione di assoluta sterilità dai comuni batteri coltivabili e visibili, si può ottenere l'immunità antivaccinica nei cani, nelle pecore, nelle capre e negli asini inoculandolo per la via endovenosa o sottocutanea.

II. L'immunità si ottiene tanto inoculando negli animali dosi progressivamente crescenti di vaccino filtrato, quanto dosi uguali, purchè tra una inoculazione e l'altra interceda un numero adeguato di giorni d'intervallo (5-7 giorni): l'inoculazione in una sola volta o in numero limitato di volte della quantità totale di filtrato che riesce immunizzante, inoculata in dose progressivamente crescente, non immunizza gli animali.

III. L'immunità acquisita dagli animali, si rende manifesta con la comparsa, nel siero di sensibilizzatrici specifiche antivacciniche, dimostrabili con la prova del Bordet, servendosi di vaccino sia non filtrato, sia filtrato, purchè in quest'ultimo caso il filtrato sia adeguatamente concentrato e con il risultato negativo della vaccinazione praticata sulla cute dell'addome con vaccino attivo non filtrato.

IV. L'immunità antivaccinica provocata negli animali è un'immunità generale cui partecipa quindi anche la cute.

V. Nei sieri degli animali immunizzati pare si trovino delle sostanze antivacciniche.

N.B. — I risultati di questo lavoro sono tali da impormi la necessità di praticare analoghe esperienze anche nei bovini. Io spero quindi che la mia domanda di un sussidio per poter continuare in queste ricerche verrà questa volta accolta dal Ministero cui già ne feci presente il bisogno. Vien da sè che l'intimo legale che passa tra vaccino e vaiuolo, mi fanno insistere su questa richiesta non essendo improbabile che quanto vale per il vaccino possa anche valere per il vaiuolo.

ERRATA-CORRIGE

Nella memoria del Prof. O. Casagrandi « Sul conferimento dell'immunità antivaccinale, ecc. » a pag. 552, linea 18ª, leggasi « *le Berkefeld* V » invece di « *le Berkefeld* W »; a pag. 556, penultima riga, leggasi « *acqua distillata*, filtrato, *concentrato*, ecc. » invece di « *acqua distillata*, *concentrato*, ecc. ».

Istituto d'Igiene della R. Università di Cagliari

Sulla trasmissibilità dell'infezione alteridica da animali recettivi a refrattari (*)

Nota sperimentale di O. CASAGRANDI e P. BARBAGALLO.

Le indagini che avevamo eseguite nel 1904 sulla trasmissibilità dell'infezione alteridica da colombo al colombo, dal passero al colombo e dal passero ad uccelli di altra specie (oche) refrattari, in condizioni naturali, all'infezione alteridica, ci avevano condotto a trovare che era possibile trasmettere l'infezione dal passero al colombo, ma non già agli altri uccelli refrattari all'infezione, sia pure predisposti con inoculazioni di sieri anticomplementari (1).

Abbiamo quest'anno ripreso le ricerche, basandoci sui risultati da uno di noi raggiunti riguardo al meccanismo d'azione delle recidive alteridiche nei colombi, dalle quali si deduceva che il momento, in cui una qualsiasi causa predisponente viene ad agire sui colombi, nel determinare la ricomparsa in circolo di forme alteridiche, dal siero di sangue dell'animale si possono estrarre, a mezzo dell'alcool, delle sostanze, che sono dotate di azione auto-iso- ed eterolitica, resistenti alla temperatura di 100° C., non filtrabili attraverso le candele di porcellana, se sospese in Na Cl al 0.85 %, solubili nei solventi dei grassi ma non in tutti, e precisamente male nell'etere di petrolio (2).

Tali sostanze parevano avere anche una particolare importanza nella malaria umana, perchè uno di noi le aveva trovate nel siero degli uomini malarici nei vari periodi dell'accesso, massime nell'acme dell'elevazione termica (3).

(*) Lavoro eseguito in Catania dal 21 agosto al 20 dicembre 1906.

(1) *Sulla trasmissibilità dell'infezione alteridica per mezzo del sangue infetto.* Atti Soc. Malaria, Vol. VI, 1905.

(2) O. Casagrandi. *Sulla recidività alle infezioni.* Questi Ann. Igiene sper. Roma, 1906.

(3) O. Casagrandi. *Antiemolisine ed emolisine coctostabili nell'infezione malarica dell'uomo.* Atti Soc. Malaria, Vol. VII, 1907.

Nelle nostre ricerche ci siamo serviti di queste sostanze emolitiche, tratte da uccelli alteridici, per predisporre all'infezione alteridica uccelli che vi sono refrattari in condizioni naturali. E precisamente le abbiamo estratte dalla massa sanguigna di colombi alteridici per inocularle a galline domestiche e faraone, che infettavamo con sangue di passeri alteridici.

A tal uopo, avendo ancora a nostra disposizione 7 colombi fortemente alteridici, li abbiamo lasciati a digiuno tre giorni (perchè il digiuno favorendo la recidiva alteridica permette che il sangue si arricchisca di forme parassitarie) e poi li abbiamo interamente dissanguati e da tutta la massa sanguigna — essiccata a bagno maria — abbiamo estratto con l'alcool a 70°, seguendo sempre lo stesso procedimento già descritto in altro lavoro (1), le sostanze alcool-solubili. Evaporato poi l'alcool in capsule di porcellana, il materiale rimasto nella capsula l'abbiamo ripreso con soluzione di Na Cl al 0.85 %, e di questa emulsione ci siamo serviti per gli esperimenti, i quali vennero eseguiti su tre galline domestiche e due faraone. Delle tre prime galline due vennero inoculate nelle vene ed una nella cavità toraco-addominale; delle altre due una nelle vene e l'altra nel cavo toraco-addominale. La quantità di emulsione inoculata per ogni volta nelle vene, fu di 5 cmc., quella inoculata nel peritoneo di 15 cmc.
Costantemente dopo un'ora dall'iniezione dell'emulsione, nella prima gallina domestica venne inoculato del sangue di passeri infetti di alteridi: costantemente poco tempo prima di procedere alla iniezione dell'emulsione venne, nella seconda gallina, fatta l'iniezione del sangue dei passeri infetti. Nella terza gallina l'inoculazione del sangue dei passeri si fece sempre quasi contemporaneamente all'inoculazione delle sostanze alcool-solubili. Nella prima gallina faraone le due inoculazioni furono fatte come nella seconda gallina domestica; nella seconda gallina faraone come nella terza gallina domestica. Ogni volta non s'impiegarono meno di 2 passeri, mai più di 10. Le inoculazioni del sangue infetto vennero fatte tutte (salvo una volta) nella massa muscolare del torace e la quantità di sangue variò da 3/10 a 1 cmc. Operammo, del resto, nel modo già descritto nell'altro nostro lavoro sulla trasmissibilità dell'infezione alteridica; solo aggiungiamo che riuscimmo quasi sempre ad inoculare sangue fluido intero.

Riportiamo i risultati degli esperimenti in dettaglio, trascrivendo prima i diari degli esperimenti eseguiti sulle galline domestiche e poi quelli degli esperimenti eseguiti sulle galline faraone.

Esperimento I. — 21 agosto-25 settembre 1906.
21 agosto. — Si inoculano nel cavo toraco-addominale 15 cmc. di emulsione e subito dopo, nello spessore dei muscoli toracici, 1 cmc. di sangue di passeri alteridici.

(1) V. O. Casagrandi. *Antiemolisine ed emolisine coctostabili*, loco citato.

23 agosto. — Si ripete l'esperimento, che decorre nell'identico modo.

25 agosto. — Si ripete l'esperimento: si inoculano nei muscoli cmc. 0.75 di sangue alteridico.

26 agosto. — Si ripete l'esperimento: si inoculano nei muscoli cmc. 0.50 di sangue alteridico. Si esamina il sangue dell'animale con risultato negativo.

27 agosto. — Si ripete l'esperimento: si inoculano nei muscoli cmc. 0.50 di sangue alteridico. Si esamina il sangue dell'animale con risultato negativo.

28, 29, 30, 31 agosto — Si ripete l'esame sempre con risultato negativo.

1° settembre. — La gallina si trova con la testa fuori della gabbia quasi priva di sensi: si riesce a salvare in tempo. L'esame del sangue rivela una sola forma endoglobulare in un preparato: se ne fecero subito altri 12, ma non fu possibile riosservare tale reperto.

2, 5, 9, 11, 12, 16, 18, 21 settembre. — Si ripete l'esame sempre con risultato negativo.

22 settembre. — Si tiene l'animale con le zampe nell'acqua per 5 ore e si ripete l'esame. Il risultato dell'esame del sangue è sempre negativo.

25 settembre. — Si uccide la gallina e si esamina il sangue del cuore, della milza, del rene, del fegato, dei grossi vasi, la polpa cerebrale, sempre con risultato negativo riguardo alla presenza di parassiti

Quest'esperimento dimostra che con l'inoculazione endotoracoaddominale delle sostanze emolitiche alcoolsolubili estratte dal sangue di colombo alteridico e con quella di sangue di passero alteridico non si riuscì ad ottenere una vera e propria infezione alteridica in una gallina domestica, anche sottomettendola all'azione di cause debilitanti. L'unica forma parassitica endoglobulare osservata, non può di certo significare, che fosse avvenuta una moltiplicazione dei parassiti nel sangue della gallina.

Esperimento II. — 26 settembre-1° novembre 1906.

26 settembre. — Si inoculano nella vena dell'ala 5 cmc. di emulsione. Dopo 1 ora si inoculano nella muscolatura del torace cmc. 0.50 di sangue di passeri infetti.

27 settembre. — Si ripete l'esperimento: la quantità di sangue infetto è di cmc. 0.35.

29 settembre. — Si ripete l'esperimento: la quantità di sangue infetto è di 0.75 cmc.

30 settembre. — Si ripete l'esperimento: l'inoculazione dell'emulsione si fa in una vena dell'arto inferiore; la quantità di sangue infetto è di 0.35 cmc. Si esamina il sangue con esito negativo.

1° ottobre. — Si ripete l'esperimento: la quantità di sangue infetto è di cmc. 0.50. Si esamina il sangue con esito negativo.

2 ottobre.— Si ripete l'esperimento, che si conduce come il precedente.

4 ottobre. — Si esamina il sangue con esito negativo.

6 ottobre. — Si esamina il sangue: si trova una forma endoglobulare. Si tiene allora a digiuno l'animale.

7 ottobre. — Si ripete l'esame con risultato negativo.

8 ottobre. — L'animale è sempre a digiuno: si esamina il sangue e si trovano entro i globuli rossi forme semilunari con pigmento uniformemente sparso. Si trovano in 4 preparati *42* forme: nessuna se ne trova libera.

9 ottobre. — Si alimenta molto scarsamente l'animale; si osservano ancora delle forme endoglobulari, ma non tutte a pigmento sparso: qualcuna anche a pigmento ammassato ai due poli.

10 ottobre. — Si osserva qualche forma libera allungata: il pigmento è fino e sparso: queste forme sono mobili.

14 ottobre. — Si osserva qualche forma endoglubolare ancora.

16 ottobre. — Fino a questo momento l'animale si è tenuto quasi a digiuno: giudicando l'esperimento sufficientemente dimostrativo, temendo di perdere l'animale, che si vuole per altre ricerche salassare, si rimette a razione ordinaria.

20, 26 ottobre. — Si torna ad esaminare il sangue delle galline: il risultato è costantemente negativo.

27 ottobre. — Si torna a mettere a digiuno l'animale.

29 ottobre. — Si esamina il sangue della gallina con risultato negativo: l'animale è sempre a digiuno.

31 ottobre. — Si ripete la prova e si ha uguale risultato. Si torna allora a mettere l'animale a razione ordinaria.

1° novembre. — Si dissangua l'animale e nel sangue si ricercano le sostanze emolitiche coctostabili: esse (*16 nov.*) non si trovano nel siero.

Questo esperimento dimostra che fu possibile trasmettere l'infezione alteridica del passero alla gallina domestica, inoculandola nelle vene con le sostanze coctostabili emolitiche alcoolsolubili del sangue di colombo alteridico e poco dopo nei muscoli con il sangue alteridico del passero. Le prime forme alteridiche si osservarono trascorsi 11 giorni dal primo esperimento e dopo 3 giorni dall'ultimo: endoglobulari prima ed extraglobulari dopo. L'infezione durò 12 giorni. L'animale fu tenuto a digiuno e ad alimentazione deficientissima appena cessate le inoculazioni predisponenti ed infettanti. Ritornato in seguito in queste stesse condizioni non recidivò.

Esperimento III. — 26 settembre-14 dicembre 1906.

26 settembre. — Si inoculano nella massa muscolare del torace cmc. 0.30 di sangue di passeri infetti e dopo un'ora nella vena dell'ala si inoculano 5 cmc. di emulsione.

27 settembre. — Si ripete l'esperimento, che decorre identicamente.

29 settembre. — Si ripete l'esperimento: la quantità di sangue infetto è di cmc. 0.50.

30 settembre. — Si ripete l'esperimento: la quantità di sangue infetto è di cmc. 0.30; l'inoculazione dell'emulsione si fa in una vena di un arto.

1° ottobre. — Si ripete l'esperimento: la quantità di sangue infetto inoculata è di cmc. 0.40.

2 ottobre. — L'esperimento decorre come nel caso precedente. Si esamina il sangue della gallina e non si trova alcun parassita.

3 ottobre. — L'esperimento si ripete: s'inoculano 0, 30 cmc. di sangue infetto. Si esamina ancora il sangue della gallina con risultato negativo.

5, 7, 9, 11 ottobre. — Si esamina il sangue dell'animale sempre con esito negativo.

12, 13, 14 ottobre. — Si tiene l'animale a digiuno per tre giorni, durante i quali si esamina sempre il sangue dell'animale: l'esito è negativo.

15 ottobre. — Si esamina ancora il sangue: si trova una forma endoglobulare su 7 preparati e un'altra su 5 osservati.

16, 17, 18 ottobre. — Lo stesso reperto sempre rarissimo. L'animale è scarsamente alimentato ed una sola volta al giorno.

19 ottobre. — Le forme endoglobulari diventano più numerose: se ne contano in un solo preparato 29.

20 ottobre. — Lo stesso reperto, ma più scarso. Si salassa l'animale e si procede all'estrazione delle emolisine alcool solubili dal siero, con (*25 ottobre*) risultato positivo.

21 ottobre. — Si osservano le prime forme extraglobulari rotonde adese ai nuclei a pigmento mobilissimo.

23 ottobre. — Lo stesso reperto. Si estraggono cmc. 1. 5 di sangue e subito si inocula nella vena di una gallina tenuta a digiuno da tre giorni

24 ottobre. — Nessuna forma parassitaria nella seconda gallina: nella prima qualche raro parassita endocellulare.

26 ottobre. — Non si riesce a trovare alcun parassita in nessuna delle due galline. Il primo animale è molto denutrito e presenta le penne arruffate.

27 ottobre. — Si esamina accuratamente il sangue dei due animali e non si riesce a trovare alcun parassita. Si torna a nutrire bene il primo animale.

29, 30, 31 ottobre. — Lo stesso reperto in ambedue le galline.

1° novembre. — Si dissangua la prima gallina: dal siero e dalla massa corpuscolare si estraggono le emolisine coctostabili con risultato positivo (*8 nov.*) dalla sola massa corpuscolare.

3, 7, 9, 15, 21, 29 novembre, 3, 14 dicembre. — Si esamina il sangue della gallina rimasta, che si è alimentata ogni due giorni soltanto, ma sempre con risultato negativo riguardo alla presenza di forme parassitarie.

Quest'esperimento dimostra che fu possibile infettare di alteridî una gallina, inoculandola prima nei muscoli del torace con sangue di passero alteridico e poi nelle vene con le sostanze emolitiche coctostabili alcoolsolubili, estratte dal sangue di colombo alteridico. Le prime forme alteridiche si osservarono trascorsi 20 giorni dopo il primo esperimento e 12 dopo l'ultimo, endoglobulari prima ed extraglobulari in seguito. Le forme parassitiche comparvero solo dopo che l'animale fu tenuto per tre giorni a digiuno e si mantennero per una

settimana. Non valse però alimentare in modo assolutamente deficiente l'animale per mantenerlo infetto. L'infezione non si dimostrò trasmissibile ad altra gallina tenuta anch'essa in condizioni di notevole denutrizione.

ESPERIMENTO IV. — 27 agosto 30 settembre 1906.

27 agosto. — Si inoculano nella cavità toraco-addominale 15 cmc. di emulsione e subito dopo nella vena dell'ala sinistra cmc. 0, 35 di sangue di passeri alteridici.

28 agosto. — Si ripete l'esperimento: si inoculano nella vena dell'altra ala cmc. 0, 30 di sangue infetto.

29 agosto. — Si inoculano nella massa muscolare del torace cmc. 0. 50 di sangue infetto. L'animale si tiene 5 ore con le zampe nell'acqua. Si esamina il sangue con risultato del tutto negativo.

31 agosto. — Si inoculano nel cavo toraco-addominale 15 cmc. di emulsione e nella massa muscolare toracica cmc. 0. 30 di sangue infetto. Si ripete l'esame del sangue con risultato negativo.

1° settembre. — Si ripete l'esame del sangue con lo stesso risultato negativo.

2 settembre. — Si inoculano nel cavo toraco-addominale 15 cmc. di emulsione e si tiene l'animale per 2 ore con le zampe nell'acqua.

3, 5. 7, 8, 9, 10 settembre. — Si esamina il sangue e non si trovano parassiti.

15, 18, 21, 27, 30 settembre. — Si ripete l'esame con lo stesso risultato.

Questo esperimento dimostra che non fu possibile trasmettere l'infezione alteridica ad una gallina faraone inoculandola nel cavo toraco-addominale con le sostanze emolitiche estratte dal sangue di colombi alteridici e contemporaneamente nella massa muscolare del torace con sangue alteridico, anche sottomettendo l'animale all'azione di cause debilitanti.

ESPERIMENTO V. — 29 agosto-1° dicembre 1906.

29 agosto. – Si inoculano nella vena dell'ala d'una gallina faraone cmc. 5 di emulsione e dopo un'ora nella massa muscolare toracica cmc. 0. 30 di sangue di passero infetto. Contemporaneamente si tiene l'animale con le zampe nell'acqua per 2 ore.

30 agosto. — Si ripete l'identico esperimento nelle identiche condizioni.

31 agosto. — Si ripete l'esperimento: s'inoculano nella massa muscolare del torace cmc. 0. 50 di sangue alteridico.

1° settembre. — Si ripete l'esperimento: si inoculano nella massa muscolare cmc. 0.75 di sangue alteridico. Contemporaneamente si tiene l'animale per due ore con le zampe nell'acqua.

2 settembre. — Si tiene l'animale per tre ore con le zampe nell'acqua.

3 settembre. — Si ripete l'esperimento come al 1° settembre.

4 settembre. — Si tiene l'animale per tre ore nell'acqua e poi si inocula con sangue alteridico.

5 settembre. — Si inoculano nella vena di una gamba 5 cmc. di emulsione e nella vena dell'altra gamba cmc. 0.30 di sangue alteridico.

6 settembre. — Si esamina il sangue: si trovano molti granuli di pigmento sparsi qua e là nel preparato: nessun parassita, nè endoglobulare, nè libero.

7 settembre. — Si ripete l'esame: dopo aver tenuto l'animale per circa due ore con le zampe nell'acqua. Nessun parassita si rinviene.

9 settembre. — Si ripete l'esame del sangue, si trovano tre forme endoglobulari su sette preparati fatti.

10 settembre. — Si trovano ancora varie forme endoglobulari.

11, 12, 13 settembre. — Lo stesso reperto si mantiene immutato.

14 settembre. — Compaiono più numerose le forme endoglobulari: si trova anche una forma rotonda libera a pigmento mobilissimo.

15 settembre. — Il reperto rimane lo stesso. Si salassa l'animale e nel siero si ricercano le sostanze emolitiche coctostabili con risultato positivo.

17 settembre. — Si trova qualche rara forma endoglobulare; ma nessuna forma libera.

18 settembre. — Lo stesso reperto. Si torna a salassare l'animale e tutto il sangue — 2 cmc. — si inocula nella vena dell'ala di una gallina messa a digiuno da tre giorni.

19, 21 settembre. — Nessun parassita si riesce a trovare nelle due galline; per ognuna si fanno 10 preparati.

23, 25, 28, 30 settembre. — Lo stesso reparto per ambedue le galline.

1° ottobre. — La prima gallina si dissangua e dal sangue, siero e massa corpuscolare a parte si procede all'estrazione delle sostanze alcoolsolubili coctostabili. Esse non si trovano (*8 ott.*) nel siero.

3, 7, 11, 15, 21, 30 ottobre, 15 novembre, 1° dicembre. — Si esamina il sangue della seconda gallina e non si trova alcun parassita.

Questo esperimento dimostra che fu possibile trasmettere l'infezione alteridica ad una gallina faraone, inoculandola con le emolisine coctostabili tratte dal sangue di colombo alteridico e contemporaneamente o quasi praticando l'inoculazione di sangue di passero alteridico nella massa muscolare del torace o nelle vene. Le prime forme nell'infezione sperimentale si trovarono trascorsi 12 giorni dalla prima inoculazione e 4 giorni dall'ultima. Esse si mostrarono rappresentate da parassiti endoglobulari ed extraglobulari: le prime più numerose delle seconde. L'infezione durò una decina di giorni. L'animale oltre che trattato con le emolisine coctostabili fu ogni tanto sottoposto all'azione di cause debilitanti. L'infezione non si mostrò però trasmissibile ad altra gallina tenuta in condizioni di denutrizione.

***

Esposte così le cinque esperienze fatte e le conclusioni cui portavano, si può a nostro avviso dedurre che è possibile trasmettere l'infezione alteridica del passero anche alle galline domestiche e faraone,

che sono refrattarie in condizioni naturali alla infezione stessa, predisponendole con la inoculazione di quelle particolari sostanze emolitiche coctostabili, che si ricavano dal siero di sangue dei colombi durante l'infezione alteridica.

Tali sostanze agiscono togliendo la refrattarietà alle galline con sicurezza, però, solo se vengono inoculate direttamente nelle vene e se gli animali sono tenuti in quelle condizioni di diminuita resistenza organica, che si sa, predispongono alla recidiva alteridica, e che sono quelle che favoriscono il passaggio nel siero delle sostanze alcoolsolubili emolitiche, che ordinariamente si estraggono dalla sola massa corpuscolare.

Certo potrebbe sospettarsi che l'infezione alteridica provocata nelle galline non fosse che apparente: potrebbe cioè credersi, che i parassiti osservati in circolo fossero gli stessi esistenti nel sangue dei passeri infetti inoculati. Tale sospetto, però, cade sia di fronte al fatto che nel sangue delle galline i parassiti compirono un ciclo di sviluppo, che andò dalle forme endoglobulari alle extraglobulari, sia di fronte a quello che il numero dei parassiti endoglobulari aumentò sino ad un massimo, raggiunto il quale comparirono quelli extraglobulari, fatti questi i quali parlano in favore di una moltiplicazione degli alteridî nel sangue delle galline.

E se questa moltiplicazione non raggiunse un grado molto forte, se, cioè, i parassiti non furono mai molti, ciò si deve al fatto, già da noi enunciato nel precedente lavoro sulla trasmissibilità delle forme alteridiche dal passero al colombo, che le forme le quali trasmettono l'infezione sono soltanto quelle capaci di dividersi per partenogenesi le quali sono incomparabilmente meno numerose delle altre.

D'altro canto agli esperimenti, già resi noti nel citato lavoro, possiamo ora aggiungerne altri di inoculazione di sangue di passeri alteridici a galline sane, dai quali risulta, senza eccezione alcuna, l'impossibilità di trovare anche una sola forma alteridica nel sangue delle galline inoculate.

Si tratta di 7 galline domestiche e di 3 galline faraone tutte tenute per tre giorni a digiuno subito dopo la prima inoculazione e due, la 5ª e la 9ª, successivamente altre tre volte per lo stesso tempo, (parte in agosto, parte in settembre); la 4ª e la 10ª vennero anche tenute, dopo la terza inoculazione di sangue alteridico, per 4 ore con le zampe nell'acqua. Esse vennero così inoculate:

la	1ª	4	volte con sangue	alteridico	in	7	giorni
»	2ª	3	id.	id.		11	»
»	3ª	5	id.	id.		21	»
»	4ª	9	id.	id.		12	»

la	5ª	4 volte con sangue alteridico in		18	giorni
»	6ª	5	id. id.	15	»
»	7ª	7	id. id.	12	»
»	8ª	9	id. id.	11	»
»	9ª	5	id. id.	10	»
»	10ª	3	id. id.	7	»

Le esperienze vennero cominciate dall'agosto e le galline furono esaminate moltissime volte durante l'agosto stesso e poi durante tutto settembre, a quando a quando in ottobre, due volte in novembre e una volta in dicembre. Il sangue inoculato fu quello stesso che servì per le inoculazioni delle galline predisposte. Esso venne inoculato non solo liquido, ma anche diluito con Na Cl al 0.85 %, o defibrinato, non potendosi naturalmente, dovendo sperimentare l'uno dopo l'altro due o tre animali, mantenere tutto il sangue molto tempo.

E' chiaro, perciò, che i parassiti alteridici, osservati nel sangue delle galline non erano quelli provenienti dal sangue infetto inoculato e che nelle galline si sviluppò realmente una nuova infezione alteridica.

***

Due fatti, però, meritavano di essere spiegati: il decorso relativamente breve dell'infezione sperimentale, senza recidive, nonostante gli animali venissero sottoposti all'azione del digiuno, che è la causa precipua della recidività alteridica nei colombi; la mancata trasmissibilità dell'infezione dalle galline infette a quelle sane messe nelle stesse condizioni di predisposizione alla recidività alteridica, cioè al digiuno.

E noi crediamo che la spiegazione si possa raggiungere tenendo presenti i caratteri delle forme alteridiche osservate nel sangue delle galline infette, i quali caratteri non sono quelli che tutto dà a credere siano proprî delle forme femminili capaci di dividersi per partenogenesi.

Ci pare cioè, che nell'infezione sperimentale siano mancate le forme partenogenetiche e, quindi, data la loro mancanza, è naturale: *a*) che non si potessero avere recidive, neppure sottomettendo gli animali al digiuno (1); *b*) che gli animali si liberassero dall'infezione assai presto;

(1) Si potrebbe anche pensare che, a differenza di quel che succede nei colombi alteridici, il digiuno non abbia provocato di per sè, nelle galline, le condizioni atte a predisporre gli animali alla recidiva alteridica, tant'è vero che nel siero delle galline non si riuscirono a scoprire sostanze emolitiche alcoolsolubili anche quando si sottomisero all'azione del digiuno.

Bisogna però riflettere che è ben vero che nei colombi tenuti a digiuno la presenza di sostanze coctostabili si ha contemporaneamente con

c) che il sangue delle galline infette non potesse trasmettere l'infezione a galline sane.

Epperò concludendo noi crediamo di poter affermare:

1. E' possibile infettare uccelli refrattari all'infezione alteridica con l'inoculazione di sangue di passeri alteridici, predisponendo gli animali con l'inoculazione endovenosa delle sostanze emolitiche coctostabili, le quali si trovano nel sangue dei colombi alteridici, purchè però si sottopongano gli animali all'azione di quelle cause, che predispongono i colombi alla recidiva alteridica, e specialmente al digiuno.

2. L'infezione che si determina negli uccelli refrattari è con molta probabilità dovuta al moltiplicarsi per partenogenesi delle forme parassitiche femminili esistenti nel sangue dei passeri infetti.

3. Tale infezione ha breve decorso, da una settimana a una settimana e mezzo, non è trasmissibile ad altre galline e a differenza dell'infezione alteridica naturale non recidiva neanche sotto l'azione del digiuno, attesa la mancanza delle forme parassitarie femminili, che sarebbero le sole capaci di ridare la recidiva alteridica anche agli animali recettivi.

---

quella dei parassiti nel sangue circolante, ma non devesi dimenticare che nei colombi l'infezione è sempre molto duratura con periodi più o meno lunghi di latenza.

Nelle galline invece l'infezione è stata sempre leggiera e transitoria. non ha avuto periodi di latenza e quindi nel momento in cui nel sangue sono comparse le forme parassitiche, le sostanze coctostabili possono esservisi trovate in così piccola quantità da non essere state dimostrabili.

Istituto batteriologico dello Stato
e Ospedale italiano in San Paulo (Brasile)

Sopra una micosi osservata in uomini e topi

Contribuzione alla conoscenza delle così dette sporotricosi

per i dottori ADOLFO LUTZ e ALFONSO SPLENDORE.

(Con le tavole da XIII a XVI).

I. — Parte prima.

Il materiale sopra cui si basa il seguente studio, fu raccolto durante vari anni, e le osservazioni ed i dati relativi erano completi da due anni circa; ma abbiamo dovuto rimandare fin'oggi la pubblicazione a causa delle difficoltà incontrate nella classificazione del microrganismo patogeno.

Inoltre, speravamo di poter procurare altro materiale della malattia umana appresso descritta, ciò che nostro malgrado non si è realizzato. Avendo intanto incontrato nella letteratura scientifica relazioni di osservazioni simiglianti, riteniamo ora opportuno pubblicare i risultati già da noi indipendentemente conseguiti.

Uno di noi (Lutz), da molti anni a questa parte, aveva conoscenza di alcune lesioni speciali che s'incontrano in San Paulo nei topi comuni (*Mus decumanus*); ma le ricerche fatte in proposito non si allontanavano di una orientazione generale, per mancanza di sufficiente materiale di studio.

Con la comparsa di casi di peste in questa capitale, avemmo occasione di esaminare sistematicamente migliaia di topi, e così riuscimmo a raccogliere materiale più abbondante.

Conseguimmo, allora, la riproduzione di lesioni, sia per inoculazione diretta, sia per mezzo di culture di un ifomiceta isolato e considerato da noi come l'agente specifico.

Finalmente abbiamo anche osservato casi spontanei nei topi bianchi allevati in laboratorio, e ci fu possibile così di riunire un materiale totale di oltre 40 casi di animali infetti.

La forma più comune di questa micosi, che si osserva spontaneamente nel topo, consiste in lesioni localizzate nell'estremità e nella coda.

Appare generalmente nella regione tarsale di una o più estremità, o in qualunque punto della coda, un gonfiore locale, ricordante le affezioni prodotte nell'uomo per la tubercolosi articolare e delle ossa.

Gli strati esterni sono edematosi e molte volte presentano una o più fistole, dalle quali può uscire una massa centrale formata di un pus caseoso. Questo sta situato nei tessuti che circondano o separano le ossa; più raramente nella parte midollare di queste.

L'osso compatto, però, mostrasi abbastanza resistente, come ben si vede nella radiografia (v. Tav. XIV, fig. *f*), che rappresenta un caso tipico.

Quando si ha comunicazione con l'esterno per mezzo di una fistola, che non lascia di essere abbastanza larga in relazione al tumore, il pus, generalmente, contiene grande quantità di vari batteri e presenta un odore di putrefazione di sostanze albuminoidi. Perciò non ci tornò facile, sul principio, d'isolare l'organismo determinante la malattia, che dapprima fu cercato fra i batteri. Siccome nessuno di questi, dopo essere stato isolato, determinò lesioni simiglianti a quelle che si ottenevano coll'inoculazione del pus, procurammo altri microrganismi, e mercè l'impiego di soluzione di soda o potassa caustica, osservammo ripetute volte la presenza di frammenti di un ifomiceta.

Esso presentavasi ora in forma di torule, ora, più raramente, di ife; con cellule di grandezza variabile e frequentemente di forma alquanto ellittica, ricordando le forme osservate nel mughetto e nelle dermatomicosi (v. Tav. XVI, I-IV). S'incontrarono in maggior numero nelle lesioni interne, il che ci fece pensare che si trattasse del vero organismo dell'affezione.

Con tale orientazione, impiegammo mezzi nutritivi di cultura meno favorevoli per i batteri e più appropriati per torule e muffe. In questo modo, ottenemmo facilmente un organismo, che presentava polimorfismo, sebbene le forme osservate si manifestassero sempre collo stesso ordine e cogli stessi caratteri microscopici, accompagnanti la trasformazione macroscopica della cultura. Le colonie, nelle culture pure (v. Tav. XVI, *a*-*g*), apparivano, dapprima, con superficie liscia e umida di colore bianco: erano allora composte di forme torulacee; in seguito assumevano un'apparenza secca e vellutata di colore meno vivo, essendo ciò dovuto a trasformazione delle forme torulacee

in ife di forma e grandezza variabile. Queste, dopo un certo tempo, si presentavano caricate di grande numero di spore ialine, che poco a poco assumevano un colorito oscuro, ricordante le spore delle muffe. Questa modificazione si manifestava macroscopicamente con una colorazione più oscura delle colonie, che si manifestava dapprima nella parte centrale.

Alla fine dell'evoluzione, le culture assumevano l'aspetto di colonie di muffe, sebbene differente pel modo di fruttificazione. Il tempo necessario per le diverse fasi di evoluzione non è costante, ma dipende da condizioni di temperatura e del mezzo nutritivo e di altre circostanze non determinate. Così il primo stadio può durare molto tempo o essere molto breve e anche, dopo molte reinoculazioni, può mancare completamante; e l'ultimo periodo della maturazione delle spore, che generalmente è molto tardivo, può apparire già molto presto, o altre volte, mancare durante un lungo periodo di osservazione. Tuttavia, non c'è il minimo dubbio sulla realtà di questa evoluzione, avendola noi accompagnata molte volte col microscopio: oltre a ciò, l'infezione si realizza con tutte le forme.

Nell'affezione spontanea del topo, le lesioni primitive e principali sono quelle descritte, e che si possono osservare durante la vita. La sua localizzazione e i risultati di certi esperimenti indicano che l'infezione naturale è il risultato di morsicature, a mezzo delle quali l'agente patogeno è trasportato nell'interno dei tessuti.

Difatti, l'organismo fu varie volte isolato dalla mucosa della bocca, e forme morfologicamente identiche furono incontrate nella mucosa dello stomaco. Oltre a ciò, le lesioni esterne possono trovarsi nelle altre estremità. Vi sono anche localizzazioni interne, in forma di tubercoli miliari isolati e poco numerosi, che si osservano nella milza, nel fegato, nei polmoni, nei reni, nelle glandole genitali e nelle sierose interne; ma il carattere poco grave di esse, a confronto delle lesioni esterne dell'estremità, indica che si tratta di formazioni secondarie.

Per riprodurre le lesioni esterne, basta caricare una penna da vaccinazione con frammenti ricavati da culture in qualunque periodo o con pus delle lesioni, o con materiale di tubercolo, e fare una puntura in una regione tarsale o nella coda di un topo bianco o nero. Nei primi giorni non si ha reazione locale distinta, il che indica che i batteri del pus non entrano nella determinazione del processo, il quale, in queste condizioni ha sempre un'evoluzione molto lenta.

Si può anche realizzare un'infezione per l'ingestione di culture, ma le lesioni che ne risultano sono poco palesi e hanno un decorso

ancora più cronico, potendo durare fino a più di 6 mesi, prima della soluzione fatale prodotta da cachessia generale. In uno di tali casi si incontrò caseificazione di molte glandole linfatiche inguinali e mesenteriche e anche delle capsule soprarenali, accompagnate da alcune piccole ulcere nella coda. Nel materiale caseoso s'incontrarono, all'esame diretto, le forme già conosciute del nostro microrganismo, e con lo stesso si ottennero culture tipiche, come anche l'infezione di un topo bianco, nella forma appresso descritta, di tubercoli multipli in tutti i visceri. Ma se, col metodo sopra accennato, solo si ottiene un'affezione a decorso lento, in cui le lesioni contengono gli elementi patogenici in numero ristretto, si può anche produrre una infezione molto più rapida ed estesa, ricordante la tubercolosi submiliare generalizzata.

Questa pseudo tubercolosi micotica si ottiene più facilmente dopo una serie di passaggi del microrganismo nei topi, usando le spore oscure, per iniezione sub-cutanea o dentro peritoneale. In questi casi d'inoculazione intensiva, il decorso può essere comparativamente rapido, durando generalmente 7 od 8 settimane: solo una volta, in un topo bianco molto giovane, la morte avvenne dopo due settimane, con lesioni molto accentuate.

In queste infezioni intense, per mezzo di spore mature, l'evoluzione degli elementi micotici sembra incontrar meno resistenza delle altre forme. Le lesioni prodotte contengono una massa enorme di frammenti del parassita, in parte degenerato, nel centro di piccoli focolai tubercoloidi, situati nei diversi visceri, dove furono trasportati dalla corrente sanguigna. Questo trasporto pare favorito dalla forma delle spore.

L'infezione si ottenne facilmente tanto nei topi neri che nei bianchi; tutti e due rappresentano gli animali d'elezione. In altre specie di mammiferi l'infezione si realizzò con molta difficoltà, ma ottenemmo una lesione locale assai tipica nel piede di una *gambà* (*Didephis azarrae*); e in una cavia un'infezione generale per mezzo di iniezione dentro peritoneale. In questo caso, solo si ebbe alterazione delle glandole linfatiche, nelle quali l'esame diretto e le culture non rivelarono altri microrganismi che gli elementi micotici in grande abbondanza.

Abbiamo ragioni per pensare che il nostro microrganismo può anche produrre lesioni locali nell'uomo, visto che fu isolato in cultura pura in uno dei casi più avanti descritti.

Già il primo di questi casi s'impose come insolito e nuovo per noi. Avendo sospetti di forme cutanee, s'inoculò la secrezione di ulcere e

granulazioni triturate in sufficiente quantità nella cavità peritoneale di un coniglio maschio, ma il materiale inoculato fu riassorbito senza reazione apparente. L'ammalato più tardi fu incontrato completamente guarito. Perciò, quando si presentò un secondo caso, fu esaminato con tutti i metodi conosciuti, riuscendosi ad incontrare, in relativa abbondanza, frammenti di un ifomiceta. Impiegando mezzi nutritivi adeguati, si ottennero facilmente culture pure con i caratteri sopra descritti, il colorito passava a poco a poco dal bianco al rosso nerastro. Queste culture furono varie volte reinoculate e sottoposte ad esami minuziosi, in modo che non si può aver dubbio sulla identità di questo microrganismo con quello del topo, per quanto la sua inoculazione in animali non potè esser fatta per mancanza di topi, e più tardi per essere le culture andate perdute.

Quanto alle lesioni osservate, per lo meno in 5 casi, sempre si incontrò lo stesso quadro clinico. Trattavasi di ulcere poco profonde di forma regolare, ovale o ellittica con fondo granuloso e margini profondamente scavati, o di ascessi superficiali di varia grandezza, da quella di un fagiolo a quella di una moneta di due franchi, che rappresentano la fase anteriore. Hanno una certa rassomiglianza col mormo cutaneo, scrofuloderma e certe affezioni di sifilide terziaria, ma con uno studio attento, si arriva ad eliminare queste ipotesi. Il numero di esse, generalmente, variava da 6 fino a 10 e talvolta più, e il punto di partenza delle nostre osservazioni era sempre o un dito o una regione carpo-metacarpica dorsale, progredendo l'affezione in modo centripeto, sicchè, ogni localizzazione nuova s'incontrava a qualche distanza dall'ultima, con la quale sembrava legata da vasi linfatici superficiali. Stava sempre limitata a una delle estremità superiori, mentre le glandole linfatiche erano indenni.

In due casi ulteriori furono dimostrati elementi di ifomiceta in grande quantità, una volta anche in tagli delle granulazioni; ma non ottenemmo la cultura, il che si può spiegare da un lato per la degenerazione degli organismi e da un altro per la soverchia proliferazione di batteri.

In un 5° caso, che riproduciamo nella Tav. XIII, avevansi ulcerazioni in forma e disposizione tipica, ma gli elementi fungini non poterono essere dimostrati. In tutti i casi si praticò la cura con l'uso interno di joduro di potassa, ma l'effetto non fu sempre molto rapido, in modo che varie volte s'impiegò un trattamento chirurgico, consistente in estirpazioni o svuotamento, che diedero ottimo risultato. Questi trattamenti furono fatti in buona parte dal dott. W. Seng, dalla di cui clinica particolare provenivano tre dei casi.

L'evacuazione del pus sembrava avere un effetto favorevole, ma, generalmente, i tessuti al disopra degli ascessi, erano di tal forma che la perforazione spontanea avveniva estesa, conducendo alle ulcerazioni già notate.

Quando facemmo e descrivemmo queste osservazioni, pensavamo di aver incontrato casi assolutamente nuovi, non essendoci stato possibile trovaare nella letteratura qualsiasi notizia, sia rispetto all'affezione dei topi sia a quella dell'uomo, e tampoco rispetto al fungo patogeno, anche quando uno di noi (Lutz) due anni fa in vari centri scientifici di Europa, mostrò preparazioni microscopiche e anatomiche, nonchè fotografie, non riuscì ad apprendere nulla rispetto a tali processi. Nè all'Istituto Pasteur, nè ai signori Plaut, Buschcke e Curtis il microrganismo e affezioni simiglianti erano conosciute, nè tampoco essi richiamarono la di lui attenzione sulla prima pubblicazione di De Beurmann che già era apparsa da parecchio tempo. Solo ultimamente abbiamo incontrato nella letteratura relazioni di lavori sopra processi infettivi, che indubbiamente erano molto affini a quelli da noi osservati. Non fu senza difficoltà che potemmo aver conoscenza di una parte della letteratura citata; in quanto tll'altra, includendo il primo lavoro di De Beurmann, l'abbiamo ricavata da estratti. Questi processi morbosi ultimamente osservati da vari autori, secondo l'esempio di De Beurmann, sono chiamati sporotricosi e devono la loro origine a un fungo che apparentemente è molto vicino al nostro. Se vi sia identità completa, solo si potrà decidere quando sarà possibile fare una comparazione minuziosa delle culture.

De Beurmann e Gougerot distinguono tre specie di *sporotrichum* isolate e descritte da De Beurmann, da Schenk e da Dor. L'ultima è certamente differente dallo altre e dalla nostra; in quanto alle due prime, se secondo B. e G. resta ancora indeciso se siano differenti.

I processi morbosi prodotti nell'uomo da questi funghi sono denominati dagli autori francesi: *sporotricosi cutanea e sub-cutanea;* e descritti come ascessi con poca tendenza a perforazione, che scompariscono con l'uso di joduro di potassa e non debbono essere aperti, al fine di evitare un'infezione dei margini. Essi citano casi di autori americani, Schenk, Hektoen e Perkins, che essi designano come *sporotricosi linfangitica gommosa,* che hanno tanta somiglianza coi nostri da sembrare clinicamente identici. Potrebbe allora darsi che per questo tipo di sporotricosi avvenisse lo stesso di quello che avviene per la così detta blastomicosi del tipo Posata e Vernike, cioè che i casi si osservano con più frequenza non solo nell'America del Nord ma anche in quella del Sud.

Per lo meno, uno di noi (Lutz) osservò anche di questa due casi sicuri ed uno probabile. E' vero che in tutti i tre casi la localizzazione primitiva dell'affezione era nella cavità boccale, arrivando in uno di essi a invadere glandole linfatiche e salivari, ma tanto per l'esame microscopico che per la cultura si notava coincidenza perfetta coi casi descritti.

Quanto alla denominazione del nostro microrganismo, ci sembra indubitabile che per la classificazione di Saccardo e di quella usata

nella nuova opera di Engel e Prantl, deve essere considerata per causa delle spore oscure, non come *sporotrichum* Linck (*Mucedinea*) ma come *tricosporium* Fr. Summa (*Dematiacea*); ma, siccome questa separazione di specie sembra forzata e poco giustificata, può continuare a usarsi il nome di sporotricosi, a causa della sua priorità.

A rispetto delle culture, richiamiamo l'attenzione, che la forma torulacea tanto determinata nella nostra specie, non è notata nè dagli autori francesi, nè dai micologi citati.

Dagli esperimenti su animali risultano molte analogie, principalmente dopo che De Beurmann e Gougerot ripeterono con risultato positivo la nostra esperienza del piede del topo, che erroneamente chiamano metodo di Piney. Del resto, essi non fanno menzione alcuna di forma di pseudotubercolosi diffusa, che si può ottenere coll'iniezione nei topi.

Anche dicono, ripetute volte, che i funghi non possono essere dimostrati con sicurezza nel pus e nei tessuti. Ciò non concorda completamente con le nostre osservazioni, perchè nelle infezioni spontanee dell'uomo e del topo, gli organismi poterono essere distintamente riconosciuti all'esame microscopico. Tuttavia, conviene menzionare che i funghi degenerano rapidamente e in ultimo restano calcificati, riuscendone difficile la colorazione, senza di cui, in mancanza di pratica, difficilmente si riconoscono.

Pare anche che nelle infezioni spontanee, che sono meno intense, passato un certo periodo abbastanza corto, favorevole alla vegetazione, trovansi raramente o scompariscono del tutto. Le forme nei tessuti sono mal sviluppate e rachitiche e circondate da una capsula di vario spessore, in modo da essere abbastanza differente dalle forme di cultura.

Nelle infezioni esperimentali possono essere incontrate senza difficoltà, formando talvolta delle vere colonie, nelle quali un campo microscopico contiene tutte le forme osservate. L'immagine microscopica del materiale patologico umano corrisponde a formazione di pus e granulazioni, come si osserva in altri processi morbosi. Nel topo osservammo, ne' tubercoli esperimentali del peritoneo, una calcificazione molto accusata.

In riguardo all'infezione umana, conviene citare ancora che può essere determinata per la morsicatura di animali infetti; in altri casi, l'ammalato si ferisce durante il lavoro e probabilmente s'infetta con la sua propria saliva. Che questo liquido frequentemente contiene de' funghi di questo ordine risulta dalle nostre osservazioni nei topi e anche dal caso descritto dal Dor.

II. — Parte seconda.

A complemento delle nostre orservazioni precedenti raccogliamo qui appresso fatti e documenti, accompagnati da fotografie e disegni dimostrativi delle lesioni micotiche osservate sull'uomo e sui topi infettati spontaneamente, nonchè sugli animali d'esperimento e del microrganismo specifico da noi isolato e coltivato. I casi riferibili all'uomo, come già si disse, furono cinque, alcuni de' quali provenienti dalla clinica privata del nostro amico e collega dott. W. Seng, a cui restiamo grati delle gentilezze, avendo lo stesso cortesemente eseguita la fotografia del 5° caso, che riproduciamo (v. Tav. XIII), e avendoci aiutato nell'esecuzione delle radiografie (v. Tav. XIV, *b, f*) riferibili a' topi.

Detti casi furono osservati tutti ambulatoriamente, meno uno, che rimase, per qualche tempo, sotto la nostra osservazione nell'Ospedale italiano « Umberto I »; di quest'ultimo caso, ch'è molto tipico, riporteremo la storia per intero, mentre degli altri, per ragione di brevità, daremo notizie riassuntive.

I soggetti erano tutti europei, dimoranti però in Brasile da lungo tempo.

La prima osservazione rimonta al 1902 e riferiscesi ad un giovane di vent'anni d'età, di nazionalità spagnuolo, inserviente di laboratorio. Lo stesso si presentò con varie ulcerazioni disseminate sull'avambraccio sinistro. L'ammalato non seppe fornire notizie anamnestiche circa l'apparizione delle stesse; nulla chiariva la storia prossima o remota di lui; circa l'affezione, non risultavano precedenti, nè ereditari nè personali, come tubercolosi o sifilide od altre affezioni. L'organismo dell'individuo era di buona costituzione e nessun organo interno mostravasi ammalato, nè lo stato generale risentiva dall'affezione del braccio. Questa consisteva principalmente in ulcerazioni poco profonde, di forma ovalare, con fondo granuloso e margini profondamente scavati, nonchè di piccoli tumoretti sottocutanei; alcuni di consistenza duro-elastica, della grandezza d'un grosso cece; altri di consistenza più molle, della grandezza di una piccola noce; ricoperti i primi, da pelle normale, i secondi da pelle alquanto arrossita, rappresentando, evidentemente, una fase anteriore dell'ulcerazione. Il numero di tali lesioni non superava una diecina. Ulceri e tumori erano indolenti spontaneamente, mentre, alla pressione, davano un piccolo senso di dolore.

Niente reazione febbrile, niente infiltrazione delle glandole linfatiche.

Aperto colle debite cautele antisettiche uno di questi tumori, ne venne fuori un liquido purulento. Iniettata una parte di pus e granulazioni triturate nel peritoneo di un coniglio maschio, non si ottenne nessun risultato d'infezione. L'ammalato fu trattato con uso interno di ioduro di potassa e in pochi giorni le lesioni descritte scomparirono perfettamente.

Il 2° caso fu incontrato sulla fine del 1903 ed appartiene ad un uomo italiano, di 45 anni di età, macellaio. Questi presentava un'ulcerazione sul dorso della 2ª falange del dito indice della mano destra. Nessun dato anamnestico, o ereditario o personale, come nessun segno d'infezione, s'incontrava nell'organismo, il quale si mostrava in generale sano.

L'individuo narrò che l'affezione in atto era cominciata come un piccolo foruncolo, attribuendone la causa a qualche morso d'insetto, passato inosservato.

L'ulcerazione presentava i bordi sollevati, di aspetto lardaceo, scavati in basso, col fondo granuloso. Oltre a ciò, due piccoli noduli sottocutanei esistevano alla regione dorsale del polso corrispondente, della grandezza d'un piccolo cece, di consistenza duro-elastica, aderenti colla pelle. liberi al fondo. La pelle si mostrava normale. I tumoretti erano indolenti. Nessuna infiltrazione delle glandole linfatiche della regione; nessun'alterazione nello stato generale. Aperti questi piccoli noduli, uscì fuori un liquido sieroso torbido, di cui si fecero esami con metodi di colorazione, nonchè culture sopra vari mezzi nutritivi e iniezione peritoneale in una cavia. L'esame microscopico non lasciò vedere microrganismi; delle culture, una sola diede luogo allo sviluppo d'un ifomiceta, i di cui carratteri corrispondono a quelli che abbasso descriveremo; la cavia, dopo un paio di settimane, presentò, in corrispondenza del punto d'inoculazione, una piccola infiltrazione; ma questa ben presto si riassorbì, senza lasciar traccie I bordi dell'ulcera, tagliati ed esaminati coi metodi del Weigert e di San Felice, mostrarono in scarsa quantità degli elementi rassomiglianti a torule ovali e dei rarissimi frammenti di ifi.

L'ammalato, trattato chirurgicamente dal dott. Seng. guarì perfettamente in seguito a plastica della regione ulcerata e a somministrazione di alte dosi di ioduro di potassa consigliate dal dott. Lutz.

Il 3° caso, incontrato nello stesso anno (1903), riferiscesi ad un giovane di 25 anni d'età, italiano, pure macellaio.

L'ammalato presentava una serie di noduli sottocutanei, in varie regioni dell'arto superiore sinistro. Nulla s'incontrò nei precedenti ereditari e personali, nè segni di sifilide, nè di altra infezione, recente o antica.

L'individuo raccontò che un giorno, lavorando del suo mestiere si ferì con un osso, conficcandosi alcuni frammenti di questo nella prima falange del terzo dito della mano sinistra. Estratti questi frammenti, in pochi giorni la ferita si chiuse, ma la regione rimase un pochino gonfia, risentendo il soggetto, nella stessa, una sensazione di corpo estraneo. Dopo due mesi circa, si avvide che nella regione cubitale del gomito era apparso un nodulo, ed altri ne apparirono in seguito, su tutto l'arto, alcuni dei quali, dopo 5 o 6 settimane, vennero ad ulcerazione; in seguito di che l'ammalato richiese l'aiuto medico.

All'esame obbiettivo, l'ammalato presentava le seguenti lesioni: una ulcerazione in corrispondenza della regione dorsale della prima falange del terzo dito della mano sinistra, occupante l'intera regione articolare della stessa, di forma ovalare, larghezza poco più di un centimetro. con fondo granuloso, margini duri lardacei. a base scavata; un nodulo nella regionem ediana dell'avambraccio, tre alla piega del gomito, ed uno nel terzo inferiore del braccio, nonchè altri tre piccoli noduli invisibili, ma

palpabili, sul braccio stesso; tutte le lesioni erano nella regione flessoria dell'arto.

Detti noduli, di consistenza dura pastosa, erano indolenti spontaneamente e mobili colla pelle a cui erano aderenti; alcuni avevano la grandezza d'una piccola noce avellana, altri di un piccolo uovo di piccione, altri ancora più piccoli, invisibili ma palpabili, erano grandi quanto un grosso cece.

La pelle che ricopriva questi ultimi era perfettamente normale, mentre quella de' più grandi era arrossita, mostrandosi prossima ad ulcerazione. Il tumore più grande, situato al lato radiale della piega del gomito mostrava già una piccola apertura. I tumori più grandi, aperti, lasciarono venir fuori una sostanza siero-purulenta, la quale, esaminata al microscopio con vari metodi di colorazione, in una sola preparazione mostrò scarse forme torulacee rassomiglianti a quelli del caso precedente; uguali forme si riscontrarono anche in alcuni tagli di granulazioni; le culture, però, rimasero sterili. I tumori piccoli del braccio scomparirono senza trattamento locale, dietro trattamento interno con ioduro di potassa, come guarirono le altre lesioni trattate chirurgicamente.

Il 4° caso, osservato nell'ospedale italiano « Umberto I » nel 1905, è il seguente: G. V. di anni 29, italiano, infermiere. Ha genitori e un fratello vivente in buona salute. Non ha sofferto sifilide e non è alcoolista, ma forte fumatore. Ha sofferto il diabete mellito negli ultimi anni; ma non si ricorda di altre malattie, meno della presente. Dice che, nel mese di settembre ultimo, una mattina, stando coricato, nel deporre un sigaro sopra una cassetta, a piè del letto, nella quale si trovavano dei biscotti, posando il braccio si sentì mordere ad un dito. L'ammalato dice che non vide di che natura era l'animale; ma suppone che trattavasi di un topo: notò un forte dolore, riportando una piccola ferita alla faccia dorsale della giuntura del dito indice della mano sinistra, con fuoruscita di sangue, la quale ferita guarì in pochi giorni, dietro disinfezione con acqua al sublimato e medicatura al iodoformio. Se non che, dopo un paio di settimane dal fatto, il paziente cominciò ad avvertire un senso d'intorpidimento all'arto corrispondente e si accorse della comparsa di un piccolo nodulo sulla regione inferiore palmare dell'avambraccio; indolente spontaneamente, ma pungente alla pressione.

Era un nodulo quanto un piccolo cece, di colorito rossastro, che mostrato ad un sanitario, fu aperto e causticato con nitrato d'argento. Questa piccola affezione, guarì in vari giorni, lasciando una cicatrice molto evidente; ma nel frattempo, altri noduli comparirono sullo stesso arto, aumentando il senso d'intorpidimento; per la qual cosa, al 1° aprile 1905 l'ammalato entrò nell'ospedale italiano « Umberto I », onde essere curato.

Stato presente: Uomo di statura e sviluppo scheletrico regolare, con musculatura forte, pannicolo adiposo normale.

Presenta una piccola cicatrice alla regione lombare destra, riferibile ad un furuncolo sofferto da piccolo; una piccola cisti sebacea alla regione posteriore del collo e alcune alterazioni alla regione del braccio sinistro, che qui appresso andiamo a descrivere.

Notasi nel detto arto, alla regione palmare del terzo inferiore dell'avambraccio, una piccola cicatrice irregolare, in corrispondenza della re-

gione radiale, trasversalmente disposta sui tendini del flessore superficiale comune, coll'estensione irregolare di un centimetro e mezzo circa (cicatrice del caustico).

Presso alla piega del gomito, e proprio sull'estremo ulnare della detta piega, notasi una zona d'infiltrazione, larga 3 cm., rotonda, su cui si nota un grande nodulo cupoliforme, lentamente innalzantesi dalla superficie, di colore rosso-bruno, facente corpo colla pelle; il colore si va facendo sempre più pallido alla periferia, più rosso alla sommità, dove si nota anche un'abrasione dell'epidermide. Attorno a detto nodulo più grande, se ne notano altri tre piccoli, del volume di un cece, coperti da un'epidermide più sbiadita, i quali, anch'essi, sono aderenti alla pelle, notandosi alla palpazione continuazione tra il nodulo grande e i piccoli. Tutti i detti noduli si muovono con la pelle e non sono aderenti ai muscoli sottostanti.

Sul nodulo grande si percepisce un senso di fluttuazione; nulla nei piccoli, i quali si mostrano consistenti. Essi non arrecano dolore spontaneo, ma alla pressione generano un senso disgustoso di puntura.

Sulla regione dorsale (estensoria) del braccio, notasi tra il terzo superiore e il terzo inferiore, un altro nodulo della stessa natura, ma oblungo, parallelo alla lunghezza dell'arto, colle dimensioni di due centimetri di lunghezza per uno di larghezza, il quale, a sua volta sembra rappresentare la riunione dei due noduli più piccoli; la pelle che ricopre tale infiltrazione è di colore rosso sbiadito, mostrando l'epidermide delle abrasioni. Non si nota sulla stessa alcun senso di fluttuazione. Sulla regione estensoria dell'avambraccio in generale, e specialmente sulla metà ulnare, sul terzo superiore e medio dell'avambraccio, si nota una serie d'infiltrazioni di forma rotonda irregolare con grandezza da un acino di miglio ad uno scudo, coperta da superficie rosso-bruna. Nel terzo medio dell'avambraccio l'infiltrazione è generale, come può constatarsi alla palpazione, distinguendosi su di essa i diversi punti, un poco sollevati e rossi.

Nello spazio compreso fra i diversi noduli su descritti, in corrispondenza dei punti dove la pelle si mostra di apparenza normale, si palpano dei noduletti sottocutanei invisibili all'ispezione; potendosi contare in tutto l'avambraccio, fra grandi e piccoli, un numero totale di quindici noduli.

Non si notano glandole sottoascellari. Il paziente sollevando il braccio avverte un senso di formicolio e dice che nota, nell'avambraccio affetto, una diminuzione di forza.

Procedendo con tutte le cautele antisettiche, all'apertura dei noduli più grandi, si osservò la fuoruscita dagli stessi di un materiale sieropurisimile, che esaminato direttamente al microscopio con vari reattivi e con vari metodi di colorazione, non mostrò microrganismi, salvo alcuni rarissimi elementi ricordanti delle forme torulacee ovalari, che col metodo di Gram o di Sanfelice restano colorati in violetto; ma le culture, sopra vari mezzi nutritivi, rimasero sterili e due cavie, inoculate nel peritoneo e sotto cute, col materiale, non presentarono alcuna infezione.

L'ammalato rimase lungo tempo in cura, facendo uso interno di ioduro di potassa e le descritte manifestazioni e disturbi andarono scomparendo molto lentamente, restandone, peraltro, ancora vestigia, quando l'indi-

viduo lascia l'ospedale, dopo vari mesi, non avendo noi più notizie del di lui stato.

Il 5° caso, di cui riportiamo la fotografia gentilmente eseguita dal dott. W. Seng (v. Tav. XIII), appartiene ad un colono di nazionalità austriaca: trattravasi di un giovane di 28 anni d'età, che non presentava segni di sifilide nè recente nè pregressa, nè altri segni di malattia ereditaria o personale. Gli organi interni e lo stato generale erano sani. Il soggetto disse che stando in fazenda, aveva subito varie volte morsicature di moltissimi insetti, dopo di che inavvertentemente vide apparire nelle varie regioni dell'arto superiore sinistro, numerose piccole nodosità, che, dopo un mese o poco più, vennero ad ulcerazione. Le ulcerazioni, numerose, presentavano margini dentellati, frastagliati e infiltrati col fondo granuloso. Erano indolenti. Notavasi anche, qua e là, delle piccole nodosità sulla pelle sana, indolenti come le ulcere.

Nessuna alterazione nella sensibilità generale, nè glandole nella regione ascellare. L'ammalato guarì dopo meno di due mesi mercè applicazione d'impacchi al sublimato esternamente, e ioduro di potasso all'interno. L'esame microscopico fatto del materiale ricavato antisetticamente dal fondo delle ulceri e dai noduli cutanei, non presentò alcun germe.

La malattia spontanea de' topi riscontrata moltissime volte tanto nel *Mus decumanus* di strada che nei topi bianchi allevati in laboratorio, si presenta quasi costantemente, con caratteri uguali. Le prime lesioni che richiamano l'attenzione dell'osservatore, come già si disse. sono de' gonfiori caratteristici in uno o più arti, ricordanti la tubercolosi articolare dell'uomo, notandosi un edema diffusa nella regione tarsale, spesso con delle fistole, da cui scappa fuori una sostanza caseosa. Anche la coda si mostra spesso alterata, bitorzoluta e piena di ulcerazioni. Altre ulcerette, a stampo, si vedono frequentemente sulla regione dorsale dei piedi, specialmente a livello dell'attacco delle dita. All'autopsia, per lo più, si trovano le glandole linfatiche ingorgate, alcune delle quali spesso caseificate: talvolta il fegato è sparso di scarsi tubercoli duri, di color bianco sporco, della grandezza fino ad una piccola testa di spillo; la milza per lo più ingrandita e congesta, i polmoni sparsi di piccoli ascessi; ma, in generale, scarse sono le lesioni degli organi interni, mentre, invece, come vedremo, sono molto abbondanti nell'infezione sperimentale. Procedendo ad un esame microscopico del pus estratto dalle lesioni esterne si verifica la presenza di alcune forme torulacee mescolati con altri microrganismi; esaminando, invece, il materiale proveniente dalle glandole linfatiche o dai tubercoli degli organi interni, per lo più quelle si trovano allo stato di purezza.

Il miglior metodo per constatare a fresco la presenza delle dette forme torulacee l'abbiamo trovato usando una soluzione acquosa di potassa, o

di soda caustica o di rosso neutro. Le prime mettono in evidenza il microrganismo perchè distruggono gli altri elementi cellulari, l'ultimo perchè colora, in pochi minuti, i granuli contenuti nelle forme torulacee, le quali, perciò, si rendono facilmente riconoscibili. Queste sono di aspetto ialino, talvolta con doppio contorno, alcune rotonde o rotondoidi, altre ovalari abbastanza allungate; disposte per lo più ad elementi isolati, ma spesso riunite e catena, in numero di due fino a cinque. Qualche forma si presenta gemmata; quasi tutte son fornite di un vacuolo, più o meno grande, e di vari granuli splendenti. La dimensione di ciascuna varia da 3 a 8 μ. La colorazione del detto microrganismo si ottiene, si può dire, con tutti i metodi comuni pe' batteri, non escluso quello del Gram, ma nessuno di tali metodi offre, per lo studio, migliori vantaggi di quello a fresco.

Colture.

Lo sviluppo di questo microrganismo si consegue in tutti gli ordinari terreni nutritivi, verificandosi, però, meglio nei mezzi glucosati, a condizione di aerobiosi, mentre anaerobicamente l'evoluzione è molto scarsa, stentata e incompleta. L'ottimo di temperatura è di 28° c., ma il microrganismo vive rigogliosamente anche all'ambiente ed alla stufa di 37°; le temperature più alte non si prestano molto bene.

Avendo constatato in diversi esperimenti la sua forte resistenza agli acidi, abbiamo approfittato di tale proprietà per poter ottenere le culture pure, o quasi, di primo acchito. L'abbiamo visto crescere perfettamente bene in terreni glucosati acidificati con acido tartarico, fino alla proporzione di ½ %. Un mezzo nutritizio da noi preferito è fatto a base di segala cornuta. Noi facciamo un infuso di detta sostanza a 10-20 p. 1000, per un quarto d'ora in acqua distillata alla temperatura di 60°, e dal filtrato di tale infuso, colle solite regole, prepariamo i terreni di coltura, liquidi o solidi, glucosati a 2 %, acidificandoli all'1, 2 e 3 ‰, con soluzione di acido tartarico. Per i terreni solidi aggiungiamo gelatina al 20 o agar al 3 %. In tali terreni nutritizi lo sviluppo del nostro microrganismo, direttamente seminando il materiale derivato dalle lesioni dell'animale, è stato sempre costante. Le prime coloniette appariscono di forma rotonda, aspetto liscio, umido, con splendore perlaceo, e gli elementi esaminati con una lente ad immersione omogenea, si presentano sempre a forma di torule, di aspetto ialino, più o meno rotonde o rotondoidi od ovalari, con dimensioni di 5 a 6 μ, presentando un vacuolo, e granuli splendenti nel contenuto.

Diamo qui appresso lo sviluppo ulteriore, verificato ne' trapianti di tali colonie nei diversi terreni di coltura (v. Tav. XV e XVI).

Nella *gelatina comune*, per strisciamento, solo dopo il terzo giorno compariscono de' piccolissimi punti, appena percettibili. Questi sono di colorito bianco sporco e aspetto umido. Visti al microscopio, a 50 diametri, appaiono come coloniette rotonde con margini lisci e contenuto finamente granuloso, i di cui elementi, ad opportuno ingrandimento, si rivelano come forme torulacee più o meno rotonde, di aspetto ialino contenenti un grande vacuolo e due o tre granuli splendenti estravacuolari, avendo le dette forme una dimensione di 3 a 6 μ. Le coloniette all'8° giorno, conservando lo stesso aspetto, arrivano alla dimensione di un terzo di millimetro; al 12° giorno fino a quella di un mm. e più, cominciando a trasformarsi di aspetto, perdendo la lucidezza, per divenire bianco-fuliginose, e in seguito fioccose, al quale stadio l'opportuno ingrandimento microscopico mostra gli elementi torulacei in germogliazione, alcuni trasformati completamente in filamenti ialini, di varia lunghezza, presentando varie ramificazioni laterali e divisioni trasversali, con vacuoli e granuli splendenti in ogni segmento. La larghezza di tali segmenti è di 2 a 4 μ, la lunghezza fino a a 7-8 μ.

Verso il 20° giorno, quasi tutte le colonie son diventate fioccose e allora si può verificare che i loro elementi, già trasformati tutti in filamenti, cominciano già a presentare un discreto numero di corpicciòli ovalari o piriformi, solitari, di aspetto ialino, attaccati ad altezza alternativa, ai lati delle ife, avendo tali corpi una dimensione di 3 a 4 μ di lunghezza per 1.5 - 2 di larghezza, un vacuolo e due granuli splendenti.

In seguito le colonie cominciano a presentare un imbrunimento centrale e tale colorazione si estende gradatamente alla periferia.

Dopo un mese l'intera cultura è già trasformata, presentandosi la superficie di colorito nero con aspetto fuliginoso. A tale stato l'osservazione microscopica mostra un'enorme quantità di spore nere cadute o ancora attaccate a delle ife molto delicate, potendosi osservare che le ife presentano una larghezza appena di 1 μ, più o meno, e le spore, di forma rotonda od ovale, di 2 o 3 μ, presentando l'imbrunimento alla periferia, abbastanza spessa, mentre il contenuto è ialino, con un granulo leggermente imbrunito nel mezzo. Tali spore sono spesso solitarie, ma non è raro incontrarne un grandissimo numero accumulato e accatastato intorno alle ramificazioni delle ife.

Tale evoluzione, per altro, non è costante, verificandosi molte volte, lo svolgimento delle colonie direttamente colla forma fioccosa. In questi casi, dopo tre o quattro giorni dalla semina, cominciano a comparire sulla linea di strisciamento dei piccolissimi fiocchi bianchi irregolari, che dànno l'aspetto di frammenti di cotone rimasto attaccato sopra una superficie scabrosa di un panno, e da tale stato, la di cui evoluzione è molto lenta, dopo venti o trenta giorni, e talvolta di più, la cultura passa all'ulteriore trasformazione col colorito nerastro sopra descritto.

Per infissione dopo 3 o quattro giorni cominciano a comparire, lungo la linea percorsa dall'ago infettato, dei piccolissimi punti biancastri, appena percettibili, specialmente verso la parte superiore della gelatina, i quali al 5° giorno si trovano già discretamente evidenti, e al 12° giorno tutta la linea d'infezione comincia a presentare dei finissimi filamenti laterali, i quali, gradatamente, diventano più numerosi, specialmente verso

la parte superiore; al 14° giorno la superficie esterna dell'infissione comincia a presentare de' piccoli fiocchi bianco candidi riuniti a ciuffetto, cominciando a comparire l'imbrunimento nel centro dei medesimi verso il 20° giorno.

Per amore di brevità stimiamo opportuno ricordare che essendo più o meno simile l'aspetto microscopico degli elementi di colonie corrispondenti a diversi gradi di sviluppo, nei diversi mezzi nutritivi, crediamo inutile ripetere per ogni cultura l'osservazione microscopica degli elementi, la quale fu sempre verificata, essendo trascurabili le piccole differenze fra un mezzo nutrivo e l'altro, le quali si riferiscono, per lo più, alla dimensione degli elementi, mentre costante è il tipo in relazione al diverso stadio di sviluppo dell'organismo.

Gelatina comune con 2 per cento di glucosio, a reazione lievemente alcalina, per strisciamento: dopo 2 giorni, si presentano scarsissime coloniette puntiformi biancastre, umide, appena percettibili, presentando all'osservazione fatta con un certo ingrandimento, margini lisci, contenuto granuloso. Dette coloniette all'8° giorno presentano la dimensione di 1 mm. circa, nella quale epoca cominciano a perdere la lucentezza, per diventare opache, con margini irregolari e frastagliati. In seguito, cominciano a presentare de' piccoli filamenti laterali, pigliando l'aspetto stellato, che al 15° giorno è trasformato in fiocchi biancastri, i quali al 20° giorno cominciano a presentare annerimento centrale, che diviene generale quasi alla fine del 30° giorno.

Per infissione, si ripete, su per giù, la stessa evoluzione che nella gelatina comune, essendo, per altro, più precoce e più ricca la comparsa dei filamenti laterali del fittone, come quella della superficie libera, dove l'annerimento comincia già al 15° giorno.

Gelatina segala cornuta con 2 per cento di glucosio, a reazione lievemente alcalina: (v. Tav. XVI, *a-g*) si ottiene su per giù quello del caso precedente. Nello stesso mezzo, acidificato con acido tartarico all'1 ‰, l'evoluzione è più rapida, verificandosi l'annerimento delle colonie dopo poco più di venti giorni.

Nelle colture in gelatina, specialmente quelle fatte con segala cornuta e glucosio, acidificata, si verifica forte fluidificazione del mezzo nutritivo, la quale comincia alcuni giorni dopo l'annerimento delle colonie.

Agar comune alcalino per strisciamento, alla temperatura dell'ambiente del laboratorio: dopo due giorni cominciano ad apparire coloniette puntiformi appena percettibili, rotonde, di colore biancastro, presentando, ad un ingrandimento di 50 d., alcune, dei contorni netti; altre, dei margini frastagliati; tutte un contenuto granuloso. Al 3° giorno, alcune più grandi, presentano la dimensione, più o meno, di 1 mm., mentre il contenuto della periferia comincia a presentare le granulazioni meno addensate. Nei giorni successivi, l'aspetto esterno, da umido e lucente, diventa gradatamente asciutto ed opaco, e al 15° giorno, cominciano a circondarsi di numerosi raggi alla periferia, cominciando ad apparire un imbrunimento centrale dopo il 20° giorno, per continuare in seguito, fino ad annerire l'intera superficie; il che, in alcune culture, si è verificato dopo oltre un mese; ed in altre molto più tardivamente.

Per infissione, lo sviluppo comincia ad apparire già dopo 24 ore, con

punticini a forma di granuli bianco sporchi, appena percettibili, lungo la linea d'inoculazione, crescendo di numero e di grandezza molto lentamente nei giorni successivi.

All'8° giorno comincia a vedersi sulla superficie libera del fittone una piccola massa cerosa. Al 10° vari filamenti laterali cominciano a circondare trasversalmente il fittone, il quale, al 14° giorno presenta l'aspetto di una spazzola da tubi di vetro, alla quale epoca, la superficie esterna cerosa, già diventata più estesa, presenta dei numerosi fiocchetti bianchi, sollevati; e al 20° giorno, un principio di annerimento, che diventa quasi completo dopo un mese.

Alla temperatura della stufa 37° tali trasformazioni si rendono più tardive e il fittone meno sviluppato e meno ricco di filamenti laterali.

Al 28° invece si ha sviluppo scarso di colonie, l'annerimento comincia prima del 15° giorno.

Agar comune con 2 per cento di glucosio, reazione lievemente alcalina (v. Tav: XV, 5 e 6), per strisciamento alla temperatura dell'ambiente: già dopo 24 ore si ottengono numerose coloniette staccate, puntiformi, rotonde o rotondoidi di colore bianco sporco, con margini lisci, contenuto granuloso, superficie umida, splendente. La dimensione in pochi giorni arriva ad 1 mm. e più, e, dopo una settimana, alcune sorpassano quella di 2 mm., presentando, specialmente quelle della parte superiore del terreno nutritizio, un aspetto opaco ed asciutto, stellato, per la presenza di fili laterali a forma di raggi. Detto aspetto si va giornalmente generalizzando a tutte le colonie, le quali nel 17° giorno, sono, quasi tutte, fioccose ed asciutte, cominciando a mostrare imbrunimento centrale.

Alla stufa a 37°, dopo 24 ore, appariscono piccole colonie, numerose, puntiformi, biancastre, lisce, con splendore perlaceo, a contorno netto e contenuto granuloso, mentre al 4° giorno, in mezzo a colonie con tali caratteri, si vedono, qua e là, sparse sulla superficie del terreno nutritizio, altre coloniette di aspetto fuliginoso, a contenuto ugualmente granuloso, ma con margini frastagliati; al 13° giorno tutte le colonie presentano l'aspetto bianco opaco, con principio di fiocchi, che vanno aumentando quotidianamente, cominciando al 25° giorno il solito imbrunimento.

Alla stufa 28° c., lo sviluppo delle colonie è più rigoglioso, osservandosi, dopo 2 o 3 giorni, delle colonie rotonde, umide, liscie, splendenti, colla dimensione fino a 3 e più mm., e la trasformazione in colonie fuliginose e fioccose, in meno di una settimana, seguita da rapido annerimento generale.

Agar glicerinato 2 % (v. Tav. XV. 1): quasi la stessa evoluzione che in agar glucosio.

Agar di malto leggermente acido (v. Tav. XV, 2): all'ambiente, su per giù come agar glucosio, ottenendosi, però, generalmente colonie alquanto minori.

Alla stufa a 37°, lungo la linea di strisciamento, fin dal 2° giorno, apparisce un piccola patina biancastra, appena evidente nel giorno seguente, in cui appariscono anche delle piccole colonie staccate, puntiformi, alcune delle quali, viste ad un certo ingrandimento, presentano il solito aspetto granuloso, co' margini lisci e rotondi, altre co' margini frastagliati e filamentosi, essendo le prime con aspetto umido e splendente; le altre asciutte, con brillo opaco.

Talvolta, in alcune culture, in poco più di una settimana, la patina dello strisciamento comincia a presentare un corrugamento generale, nel quale stato persiste lungamente, mentre delle colonie staccate, alcune diventano fuliginose e raggiate, altre, dopo un mese circa, si presentano anch'esse raggrinzate, con aspetto irregolare. L'annerimento comincia dopo circa 35 giorni.

Alla stufa a 28° C., le coloniette sviluppate, già puntiformi e numerose dopo 24 ore, passando per i diversi stadi tipici dell'evoluzione, presentano l'annerimento alla fine di una settimana.

Agar segala cornuta con glucosio 2 % (v. Tav. XV, 3 e 4), alle diverse temperature ;si ottiene sviluppo più o meno come nell'agar glucosio, essendo, però, più precoce l'evoluzione, specialmente nel terreno a reazione neutra o leggermente acida. Si ottiene l'annerimento in meno di 20 giorni alla temperatura del l'ambiente; 25-30 alla stufa 37°; in una settimana alla stufa 28°.

Chiara d'uovo solidificata ne' tubi: per strisciamento, alla temperatura dell'ambiente; dopo due giorni, compariscono coloniette puntiformi, numerose, poco sollevate, per lo più isolate, alcune confluenti; rassomigliano a finissime goccioline di rugiada. Sono di colorito biancastro. Osservate a 50 diametri d'ingrandimento, si mostrano di forma rotonda o rotondeggiante, contenuto granuloso, con margini ordinariamente lisci, alcune volte frastagliati.

Sulla superficie del terreno nutritizio, s'incontrano anche de' filamenti ramificati, isolati dalle coloniette predette. All' 8° giorno, alcune raggiungono la superficie di 1 mm. o più, e, quelle nate alla superficie superiore del terreno (parte più asciutta), prendono un aspetto calcinoso, biancastro, presentandosi, qualcheduna, già nerastra nella parte centrale. Al 14° giorno, tale aspetto si rende più generale, e, alcune colonie isolate, si mostrano alquanto corrugate, col centro nerastro e la periferia bianco asciutta.

Alla stufa 37°, dopo 40 ore, si presentano numerose coloniette indistinte, puntiformi, per lo più isolate; varie confluenti, con aspetto lucente opaco. Al 3° giorno già alquanto aumentate di numero e di volume, presentando, alcune, la dimensione di 1 mm. circa; al 10°, le coloniette della parte più asciutta del terreno, si presentano raggiate e biancastre, fuliginose, asciutte; al 20°, alcune cominciano a presentare l'annerimento centrale.

Patate (v. Tav. XV, 7), all'ambiente: dopo due giorni si presentano, alla superficie, numerose coloniette rotonde, puntiformi, di colore bianco opaco, per lo più isolate, ben sollevate alla superficie. di aspetto umido.

L'acqua di condensazione è torbida, con scarso sedimento compatto e fiocchetti nuotanti. Dette colonie della superficie, sempre conservando gli stessi caratteri, vanno gradatamente aumentando di volume, toccando, alcune, verso il 15° giorno, la dimensione di oltre 2 mm., epoca in cui varie cominciano a diventare fioccose, e ne' giorni successivi gradatamente brune; e poi nerastre.

Alla temperatura di 37° c., le colonie cominciano a comparire, dopo due giorni, nella stessa maniera; al 4° giorno ne' margini secchi della patata se ne vedono alcune con aspetto biancastro calcinoso, circondati da raggi alla periferia. L'annerimento comincia dopo il 15° giorno.

Alla stufa 28° c., la detta evoluzione si verifica in una settimana circa.

Siero di cavallo solidificato, coltura per strisciamento: tanto alla temperatura dell'ambiente, che alle stufe 37° e 28°, si ottiene scarso sviluppo di colonie un poco tardivamente, principiando, per altro, colla forma rotonda, umida, granulosa, per trasformarsi, dopo alcuni giorni, in forme fuliginose, fioccose; annerendosi in seguito, dopo 15 giorni all' ambiente; dopo 25 alla stufa 37°, e dopo 8 o 10 a 28° c.

Siero umano solidificato alle varie temperature, solo appariscono una o due colonie sulla linea di strisciamento, dopo 8 o 10 giorni dall' inoculazione, presentando un aspetto bianco umido, con splendore perlaceo. Si osserva lo sviluppo massimo di tali colonie verso il 15° giorno, con la dimensione di circa 2 mm. di estensione, e discreto sollevamento.

Per lungo tempo le colonie restano in tale stato, e non presentano altra modificazione che una leggera depressione alla sommità. L'osservazione microscopica rivela la trasformazione delle forme torulacee in forma di transizione dopo più di un mese. Un accenno d'imbrunimento comincia a mostrarsi dopo circa 60 giorni.

Ne' vari *terreni liquidi*, come acqua di peptone 2%; brodo comune, semplice o glucosato, o glicerinato; infuso di segala cornuta glucosato (v. Tav. XVI, 8), tanto a reazione alcalina, che neutra o acidulata, su per giù, lo sviluppo è ugualmente lento, essendo, però, in tesi generale, alquanto più scarso e tardivo ne' terreni acidi, e in quelli mantenuti alla temperatura della stufa 37°; più rigoglioso e più rapido, alla temperatura di 28° c., specialmente nell'acqua di peptone, e ne' terreni glucosati o glicerinati a reazione debolmente alcalina o neutra. Ordinariamente, in tutti i mezzi liquidi, comincia lo sviluppo a forma di sedimento più o meno fioccoso; il liquido del mezzo rimane sempre limpido; la superficie, dopo un tempo che varia da 10 a 15 o 20 giorni, si presenta, anch'essa, coperta di colonie fioccose e biancastre, che subiscono la fase di annerimento, all'ambiente, dopo una ventina di giorni, alla stufa 37°, dopo 30 o 40; a 28° c. dopo 8 o 10.

Nell'*infuso di malto leggermente acido*, alle varie temperature: fin dal 2° giorno, si presenta un sedimento compatto e lo sviluppo di bollicine di gas, specialmente alla temperatura della stufa 37°; in seguito, ben presto, il sedimento diventa copioso; compariscono delle colonie fioccose, ne' primi giorni, al fondo; più tardi, anche alla superficie; mantenendosi il liquido del mezzo, sempre limpido. La fase di annerimento comincia dopo due settimane alla temperatura dell'ambiente; dopo 20 giorni alla stufa 37°; dopo una settimana a 28° c.

La comparsa dello sviluppo di gas, che qualche volta è notevole, non è sempre costante; ma, il più delle volte, fa difetto, malgrado il terreno nutritizio sia sempre lo stesso.

Nel *latte*, lo sviluppo è molto scarso alle varie temperature, e comincia sempre con un piccolo sedimento, che si rende apprezzabile, al fondo, solo dopo una settimana circa. Alla temperatura dell'ambiente, verso il 10° giorno: alcune piccole colonie rotonde, lucenti, granulose, appariscono sulle pareti del tubo, come si può constatare piegando la colonna del liquido, le quali, in circa due settimane, diventano fioccose, comparendo, a tal'epoca, delle coloniette fioccose, biancastre, anche alla superficie del liquido, le

quali colonie tutte, dopo il 20° giorno cominciano ad annerire. Questa evoluzione si ottiene in circa 20 giorni alla stufa 37° c., e in 5 o 6 alla stufa 28° c. Mai si osserva coagulazione del latte.

I *terreni fatti con sostanze coloranti*, come l'agar fuxina di Endo; l'agar liquido al rosso neutro di Rothberger; e il siero Petruschky, ne' quali il microrganismo si svolge perfettamente bene, non hanno mostrato nessuna modificazione di colorito. Nell'agar al rosso neutro, le forme torulacee e quelle di transizione seguono la loro evoluzione pigliando il colorito del mezzo.

Partendo, invece che dalle colonie bianco perlacee ad elementi torulacei, dalle colonie nere in sporulazione, lo svolgimento delle colture di trapianto è molto più rapido, completandosi, talvolta, l'intera evoluzione in meno di una settimana. Alla stufa di 28° c. già l'annerimento delle nuove culture si verifica al 5° giorno: specialmente ne' terreni glucosati, nel latte e nella patata. E' da notarsi che in questa serie di trapianti, provenienti dalle spore nere, ben raramente si osserva il primo stadio ad elementi torulacei, mentre, per lo più, le nuove colonie appariscono direttamente colla fase filamentosa o fioccosa; qualche rarissima colonietta rotonda e liscia ad elementi torulacei si vede, solo sulla parte più umida della superficie delle culture in agar, vicino all'acqua di condensazione; il che abbiamo osservato, specialmente sull'agar di malto.

Esperimenti d'infezione col virus dei topi.

Gli animali che servirono per scopo esperimentale furono, in tutto 34, de' quali: 10 topi bianchi; 4 neri (*M. decumanus*); 1 topo di campagna (*Mus rattus*); un topolino (*Mus musculus*); 2 cavie; 2 conigli; 4 gambà (*Did. azarrae*); 1 lepre selvatica; 2 gatti; 2 cani; 1 colombo selvatico; 1 civetta; 1 gralia; 1 rospo; 1 lucertola.

De' topi bianchi e neri nessuno sfuggì all'infezione, meno del topolino, mentre il materiale adoperato fu vario, ora provenendo da animali sia infettati spontaneamente, che artificialmente, ora da culture in vario grado d'evoluzione. La via d'ingresso per l'infezione fu o la coda o la cavità articolare di un arto, o il sottocutaneo, o il peritoneo, o la via alimentare.

Daremo qui appresso una breve descrizione di alcuni casi, tralasciando gli altri che rappresentano, tanto per il modo d'infezione che per l'esito finale, una ripetizione di casi già descritti.

Topi bianchi.

N. 1. — Inoculato nel peritoneo a' 16 maggio con emulsione di glandola inguinale di un topo nero di strada (infezione spontanea). L'animale è andato giornalmente emaciandosi, senza, però, presentare alterazioni visibili all'esterno. Venne a morte ai 13 di giugno, cioè dopo 24 giorni, mo-

strando, all'autopsia, numerosi tubercoli biancastri, puntiformi, misti ad altri più grandi, fino alla grossezza di un piccolo cece, situati sul peritoneo, sull'omento, sul fegato, sulla milza, sul diaframma e sugli organi genitali. Questi ultimi si presentavano completamente caseificati. Si verificò, allo esame microscopico diretto, la presenza di numerose forme torulacee; e il materiale de' diversi organi, seminato in diversi terreni di cultura, diede luogo allo sviluppo del nostro microrganismo.

N. 2. — Inoculato sottocute ai 25 di maggio, con emulsione di pus proveniente da un'ulcera articolare di un piede di topo nero infettato spontaneamente. L'animale, fin dal giorno successivo, cominciò a presentare un certo indurimento nella regione corrispondente al punto d'inoculazione, cioè presso l'inserzione del piede destro posteriore. Gradatamente, detto indurimento andò allargandosi, fino ad invadere l'intera regione dell'arto predetto, il quale, dopo una diecina di giorni presentava un notevole edema, presso l'articolazione del piede, e il principio di una ulcerazione coperta di un materiale purulento. Facendo l'esame microscopico di detto materiale, si constatò al microscopio una grande quantità di forme torulacee, miste a vari cocchi ed altri bacilli.

L'animale venne a morte nel giorno 1° luglio, dopo 35 giorni, presentando le seguenti alterazioni:

Corpo molto emaciato; piede posteriore destro quasi mutilato per ulcerazioni; altre piccole ulcerazioni si notavano alla coda, che era alquanto ingrossata. Aperto l'animale si constatarono numerosi tubercoli sul fegato e sulla milza; tre piccoli tubercoli sul rene destro; vari tubercoli disseminati sul peritoneo parietale e diaframmatico; molti sui genitali. Molte glandole caseificate inguinali e dorso-sacrali. Polmone e cuore di apparenza normale. L'esame microscopico rivelò numerose forme torulacee nei vari tubercoli, come nelle glandole e nell'arto ulcerato, dove si rivelarono anche, come nella coda, numerosi microrganismi per lo più a forma di cocchi e bacilli.

N. 3 (v. Tav. XIV, *d*, *e*). — Inoculato ai 13 giugno, all'articolazione di un piede, con poche goccie di un'emulsione di spore nere, tirate dalla superficie di una cultura agar di un mese, in brodo nutritivo glucosato al 2 %, addizionato di acido lattico. Dopo due giorni, già l'articolazione si presentava fortemente edematosa e notavasi un ganglio inguinale nella regione corrispondente. Dopo otto giorni, già in tutte le regioni si palpavano delle glandolette, e notavasi una congiuntivite ed una rinite, con fuoruscita di materiale sieropurulento dagli occhi, come sulle narici una quantità di piccole croste. Mostravano, questi materiali, delle forme torulacee all'esame microscopico diretto. L'animale venne a morte dopo 68 giorni, ai 14 settembre, presentando le seguenti alterazioni:

Corpo molto emaciato. Grande numero di pulci su di esso, e segnali di scabbia alle regioni auricolari. La parte posteriore del corpo mostrava una mancanza di peli sulla regione cubito-addominale sinistra; e sopra il 3° superiore della tibia esisteva una grande ulcera, di cui, parte era coperta da sostanza fibrinosa, parte mostrava la musculatura, con tendini e ossa. I margini delle ulcere erano tagliate a picco. Nell'estremità posteriore destra osservavasi, nella regione tarsale, un ispessimento diffuso, avendo, nella regione plantare, un'ulcera maggiore e due minori, e nella

regione dorsale anteriore un'ulcera maggiore e due piccole. Aperta la cavità addominale trovossi grande numero di tubercoli sparsi sulla superficie del fegato, della milza, dell'omento, del mesenterio e degli organi genitali. Nulla negli organi toracici apprezzabile ad occhio nudo. Constatossi il microrganismo all'esame diretto e alle culture del materiale patologico.

Un altro topo bianco, inoculato nel peritoneo collo stesso materiale di cultura emulsionato in brodo senza acido lattico, ha presentato sintomi meno violenti e l'infezione è stata alquanto più tardiva, verificandosi la morte dopo 15 giorni dal primo. Le lesioni anatomiche interne, per altro, erano molto rassomiglianti.

N. 4. — Inoculato nel peritoneo con emulsione di glandula appartenente ad un topo nero, morto in seguito ad infezione per via alimentare. Venne a morte dopo 27 giorni, senza presentare alterazioni esterne.

L'autopsia rivelò una tubercolosi micotica generalizzata sul peritoneo, omento, fegato, milza, diaframma e organi genitali, i quali ultimi erano caseificati.

N. 5. — Un piccolo topo bianco inoculato nel peritoneo con due goccie di emulsione di spore nere tirate dalla superficie di una cultura sopra agar glucosio di 35 giorni. L'animale venne a morte dopo 17 giorni, presentando tubercolosi micotica generalizzata in tutti gli organi addominali e ingorgo glandolare in tutte le regioni.

N. 6. — Animale nutrito con banana imbevuta da cultura in brodo glucosio di 10 giorni. L'animale morì dopo 95 giorni. All'autopsia presentavasi magrissimo e aggobbato; ma nè presentava le caratteristiche lesioni degli arti, nè tubercolosi localizzata agli organi interni, Presentava varie glandole ingorgate, in cui si constatò il microrganismo, che venne riprodotto nelle culture con tutti i suoi caratteri.

Topi neri (Mus decumanus).

N. 1 (v. Tav. XIV, c). — Infettato alla coda e al piede sinistro con cultura al secondo periodo di sviluppo. L'animale ha presentato, fin dal secondo giorno, un piccolo gonfiore alla regione inoculata, che è andato, giornalmente crescendo, propagandosi agli altri piedi, i quali, tutti, dopo una quindicina di giorni, presentavano l'aspetto caratteristico della malattia. La morte avvenne dopo due mesi e mezzo, e all'autopsia si presentarono le seguenti alterazioni:

Muscolatura color roseo molto chiaro; fegato e polmoni molto pallidi, come anche le intestina, il che sembra risultato di un'anemia generale. Sul fegato, specialmente nella concavità, si notavano circa 50 tubercoli grandi quanto una piccola lente. Nella milza, anche, esistevano tubercoli disseminati. La milza era grande, oltrepassando la linea mediana; la lunghezza era uguale a tutta la cavità peritoneale, essendo la convessità più ricca, con circa 40 tubercoli; altri ne esistevano nella concavità. Oltre dei tubercoli superficiali se ne potevano vedere altri per trasparenza nei tessuti.

I reni avevano un colore speciale che non era rosso, ma olivastro; sul sinistro si notava un tubercolo bianco, grande quanto un piccolo cece, in basso dell'ilo.

Le glandole sopra e sotto renale erano di un colore roseo molto chiaro.

Bastante sierosità si trovava nelle due pleure.

Il piede inoculato mostravasi ulcerato e necrotizzato. Metastasi negli altri piedi. Coda ingrossata e ulcerata. Non si notavano alterazioni microscopiche negli organi toracici. Constatossi la presenza del nostro microrganismo nei vari organi o umori, tanto coll'esame diretto che per mezzo delle culture.

N. 2. — Animale inoculato ai 16 di ottobre, con materiale di cultura 1° stadio, nel peritoneo. Venne a morte ai 27 di febbraio, cioè, dopo circa quattro mesi e mezzo, presentando le seguenti alterazioni: tutti i quattro piedi presentavano i soliti gonfiori caratteristici alle articolazioni. I testicoli, e specialmente il destro, erano gonfi e ulcerati, coperti di cenci necrotici e di materiale purulento. Si notavano anche grandi ulcerazioni nelle regioni dorsali dei piedi, come anche sulla coda verso la base, ulcerazioni che erano a stampo e coperte di cenci necrotici.

Gli arti più gonfi e ulcerati erano i posteriori. Notavasi anche qualche ulcerazione alla regione addominale. La coda si presentava ispessita e bernoccoluta specialmente verso la base. Le ulcerazioni sugli arti erano tutte alla regione dorsale, quelle della coda, laterali, in corrispondenza dei maggiori ispessimenti. All'autopsia, in generale, non si notò liquido nelle cavità. Poco sangue fluido nel cuore.

Polmoni e cuore di aspetto normale; fegato pallido, sparso di numerosi punticini biancastri appena percettibili. Milza ingrossata di volume, e congesta, con punticini disseminati sulla superficie, un poco più notevoli che nel fegato. Reni di apparenza normale. Nulla d'anormale nel peritoneo e sul mesenterio.

Le alterazioni interne più notevoli erano localizzate nei testicoli, che si mostravano gonfi e caseificati. Si trovarono numerose glandole ingorgate nelle diverse regioni, principalmente attorno alle trachee. Colonna vertebrale alquanto aggobbata.

Coll'esame microscopico e colle culture, si constatò la presenza del nostro microrganismo negli umori dei diversi organi e nel sangue ritirato del cuore, meno che nell'urina.

N. 3. — Animale infettato per via alimentare, con un biscotto infuso in una cultura in brodo contenente vari gradi di evoluzione del microrganismo; morì dopo circa 7 mesi. All'autopsia l'animale si trovò magrissimo e curvo.

Presentava delle piccole ulcerazioni a stampo sulla coda e sulla schiena. Nulla di caratteristico ai piedi. Aperte le cavità non si notarono alterazioni apparenti sui vari visceri, meno che sulle capsule soprarenali, che si trovarono completamente caseificate, come pure caseificate si trovarono le glandole inguinali e le mesenteriche, constatandosi all'esame microscopico del materiale caseificato, un'enorme quantità di forme torulacee, che, nelle varie culture eseguite, riconfermarono il nostro microrganismo. Con un po' di materiale dello stesso, si fece inoculazione nel peritoneo di un topo bianco, che morì con le caratteristiche lesioni, dopo 27 giorni.

Il topo campagnuolo (*Mus rattus*), infettato col metodo della scarifizione in un piede, e con inoculazione peritoneale, con materiale spore nere di una cultura di 8 mesi, ha dato gli stessi risultati che il *Mus decumanus* trattato nella stessa maniera.

Il topolino (*Mus musculus*) inoculato nel peritoneo con spore nere derivanti da una cultura di un mese e mezzo, morì dopo 14 giorni, senza presentare alterazioni riferibili al microrganismo iniettato.

Cavie. — N. 1. — Iniettata contemporaneamente al topo bianco n. 3, con cultura spore nere, sottocute: non ha presentato mai nessuna alterazione di sorta.

N. 2. — Iniettata con emulsione di tubercoli provenienti da un topo bianco infettato artificialmente; venne a morte dopo più di un anno, presentando, all'autopsia, nelle diverse regioni, numerose glandole ingorgate, alcune delle quali caseificate, entro cui non si constatarono all'esame diretto, altri microrganismi che forme torulacee, le quali, alle culture, presenrono l'evoluzione del nostro microrganismo.

I *cani* e i *conigli*, dei quali rispettivamente un esemplare fu esperimentato con iniezione di pus di topo, d'infezione spontanea all'articolazione di un piede, l'altro con culture di spore nere nel peritoneo, non presentarono alterazione alcuna.

La *lepre*, inoculata con spore nere, nel peritoneo, nemmeno.

Dei *gambà* (*Did. azarrae*): uno fu inoculato con spore nere nel peritoneo; gli altri tre, all'articolazione di un piede e alla coda, rispettivamente, con cultura di spore, con emulsione di tubercoli e con pus derivante da animale infettato spontaneamente.

Quello inoculato con pus, essendo venuto a morte dopo qualche mese per altra affezione, all'autopsia presentò un focolaio di suppurazione avvolgente l'articolazione iniettata, il di cui pus conteneva gran copia del nostro microrganismo con potere virulento abbastanza energico come si potette constatare con la reinoculazione ad un topo.

Dei due *gatti*, inoculati ai piedi e nella coda, uno con pus, l'altro con cultura, il primo fuggì e non potemmo averne più notizia; l'altro non presentò mai segni dell'infezione.

Il *colombo*, trattato con insufflazione nella trachea di spore nere, e la *gralia* con inoculazione sotto cutanea delle stesse, ugualmente non presentarono mai alterazioni.

La *civetta*, alimentata con materiale molto ricco in tubercoli micotici, per vari mesi, rimasta alla nostra osservazione, non presentò alterazione evidenti; ma non se ne potè seguire il destino, perchè fuggì anch'essa.

Il *rospo* fu inoculato con un'emulsione di spore nere nel peritoneo, e presentò, gradatamente, una specie d'atrofia generale. Dopo un mese circa, apparve per tutto il corpo una pigmentaziono rossa. L'animale fu ucciso dopo 3 mesi, per cloroformizzazione; ma l'autopsia non rivelò alterazioni macroscopiche, constatandosi, per altro, all'esame microscopico e culturale, il microrganismo, in grande quantità negli umori de' vari organi.

La *lucertola* fu inoculata nel peritoneo con una goccia di brodo contenente spore nere, e fu tenuta nella stufa 28° c. Venne a morte poco dopo di un mese presentando una cachessia generale, ma nulla di speciale, costatandosi però nei vari umori, il nostro microrganismo, tanto all'esame microscopico diretto che culturale.

Quanto all'istologia delle lesioni, le ricerche fatte sull'uomo, principalmente sulle granulazioni della superficie ulcerata, non ha rivelato

nulla di caratteristico. Ne' topi, tanto d'infezione spontanea che sperimentale, i tubercoli de' vari visceri si mostrano costituiti di un tessuto connettivale, nel quale si può distinguere una zona esterna in cui quasi non si vede se non uno spesso strato di fibrille connettivali concentriche; una zona media in cui queste si fanno più lasche, assumendo l'aspetto reticolato, le di cui maglie sono piene di forme torulacee del nostro microrganismo; ed uno strato centrale, in cui il reticolo quasi più non si scorge, notandosi invece un ammasso di elementi parassitari, misti a frammenti di nuclei e di cellule e a qualche leucocito.

L'esame delle glandole linfatiche, non ancora completamente caseificate, mostra, oltre un enorme accumulo di forme parassitarie nelle trabecole e nei seni, la presenza di varie cellule giganti sparse qua e là nella polpa, nelle quali cellule possono contarsi fino a più di una trentina di nuclei, e numerose forme parassitarie nel protoplasma.

Coi metodi delle colorazioni, de' quali ne abbiamo esperimentati parecchi, come quelli di Weigert, Van Gieson, Sanfelice, Curtis e tanti altri, abbiamo sempre verificata la facile colorabilità delle forme giovani, che sono per lo più ovalari, più o meno allungate, la di cui cromatina possiede una grande affinità per i colori d'anilina, mentre le forme più vecchie, che sono rotonde o irregolari per effetto della reciproca compressione, sono provviste di una membrana spessa e calcificata, che impedisce la penetrazione delle sostanze coloranti, potendosi, per altro, conseguire, anche in queste, un certo grado di colorazione, previo trattamento con soluzione di acido picrico.

San Paulo (Brasile), luglio 1907.

LETTERATURA.

1. SCHENK. John Hopkins Hospital Report, 1898.
2. HEKTOEN and PERKINS. (Journ. of exper. med., 5 Oct. 1900. Journ. of the Boston Soc. of. med. sc., vol. CLXXIX, 1900).
3. BEURMANN et RAMOND. *Abcès souscutanés d'origine mycotique.* (Ann. de Dermat. et de Siphilographie. Août-septembre 1903).
4. MATRUCHOT et RAMOND. *Un type nouveau de champignon chez l'homme.* (C. R. Soc. de Biologie. T. 19, 4 nov. 1905).
5. DOR (Louis). *La sporotrichose* (*abcès sous-cutanés multiples*). (La Presse Médicale, n. 30, avril 1906).
6. DE BEURMANN et GOUGEROT. *Les sporotrichoses hypodermiques.* (Ann. de Derm. et de Syph. Oct., nov. dec., 1906).
7. ID. *Sporotrichoses, présentation de cultures, pièces humaines et expérimentales.* (Bulletin de la Societé Française de Dermatotogie et de Syphilographie, n. 1, 1907).

8. DANLOS, DEBOVE et GOUGEROT. *Sporotrichoses, présentation de malades.* (Id. id.)
9. DE BEURMANN et GOUGEROT. *Note sur un nouveau cas de sporotrichose hypodermique.* (Id. id., n. 4.)
10. GAUCHER et MONIER-VINARD. *Sporotrichose cutanée hypodermique, dermique et épidermique.* (Id. id.)
11. DE BEURMANN et GOUGEROT. *Complement à notre quatrième observation de sporotrichose sous-cutanée.* (Id. id.)
12. ID. *Un sixième cas de sporotrichose; sporotrichose hypodermique et dermique.* (Id. id.)
13. H. GOUGEROT. *Diagnostic de la syphilis et de sporotrichoses sous-cutanées et cutanées.* (Annales des maladies vénériennes, mars 1907).

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE XIII-XVI.

TAVOLA XIII. — Infezione micotica dell'uomo. Caso 5; 2 viste del braccio sinistro.

TAVOLA XIV. *a*) — Topo bianco inoculato in una estremità; le altre mostrano le metastasi. Grandezza abbastanza ridotta dal vero.

b) — Radiografia di un topo nero. Si vedono le alterazioni dell'estremità posteriore e della coda, onde ebbe un'amputazione spontanea per l'infezione. Grandezza poco ridotta dal vero.

c) — Topo nero inoculato in un piede e nella coda. Si vede il primo ingrossato e ulcerato; l'ultima, in conseguenza dell'infezione, ebbe cancrena nella parte periferica. Grandezza un poco ridotta.

d) — Topo bianco giovane, morto in conseguenza d'inoculazione di spore, dopo due settimane, per pseudo-tubercolosi micotica. Grandezza naturale.

e) — Visceri del topo bianco con pseudo-tubercolosi micotica. Grandezza naturale.

f) Radiografia di topo nero con infezione spontanea. Si vede l'alterazione tarsale. Grandezza abbastanza ridotta.

TAVOLA XV. 1. — Cultura in agar glicerinato 2 p. 100 leggermente alcaline, dopo 5 giorni nella stufa 37 c. Colonie umide e liscie risplendenti, con forme torulacee.

2. — Cultura in agar di malto leggermente acida, dopo 9 giorni a temperatura ambiente di laboratorio. Forme di transazione. Si vede la trasformazione filamentosa e raggiata.

3 e 4. — Cultura in agar segala cornuta con glucosio 2 p. 100 e acido tartarico 1 p. 1000, dopo 6 giorni nella stufa 28° c. Si vedono le forme di sporulazione con annerimento progressivo delle colonie in conseguenza della maturazione.

5 e 6. — Culture in agar nutritivo, leggermente alcalino con aggiunta di glucosio 2 p. 100, dopo 30 giorni a temperatura ambiente di laboratorio. Forma e maturazione delle spore in colonie di apparenza variabile.

7. — Cultura su patata senza addizione, dopo un mese a temperatura ambiente di laboratorio. Si vede l'annerimento delle colonie per maturazione di spore.

8. — Cultura in infuso di segala cornuta, con addizione di glucosio 2 p. 100, acido tartarico 1 p. 1000, dopo 6 giorni nella stufa a 28° c. Si vede la superficie delle colonie filamentose, in parte bianche, in parte annerite, con spore immature e mature. Le colture sono di grandezza un poco ridotte.

TAVOLA XVI. — Cultura in gelatina fatta con infuso di segala cornuta e aggiunta di glucosio 2 p. 100 e acido tartarico all'1 p. 1000 in evoluzione progressiva: transizione delle colonie compatte in colonie filamentose; annerimento in *g*, per la comparsa delle spore mature.

Le figure I e IV mostrano la transazione delle forme torulacee fino a forma filamentosa con formazione di spore. La figura V mostra elementi de' tubercoli micotici del topo.

Ingrandimento da *a* a *g* circa 15 volte; da 1 a V, 1000 volte.

Annali d'Igiene sperimentale (Nuova Serie)
Vol. XVII (1907) Tav. XIII.

A. LUTZ e A. SPLENDORE.
Sopra una micosi osservata in uomini e topi.






a


b


c


d

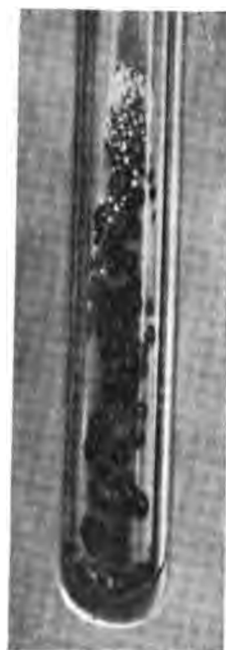

e


f



Annali d'Igiene sperimentale (Nuova Serie)
Vol. XVII (1907) Tav. XV.



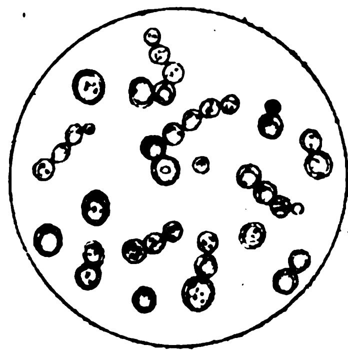





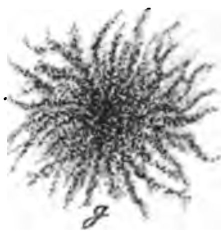


Annali d'Igiene sperimentale (Nuova Serie)
Vol. XVII (1907) Tav. XVI.

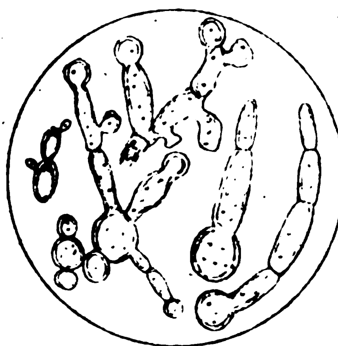
A. LUTZ e A. SPLENDORE.
Sopra una micosi osservata in uomini e topi.



I



g



II



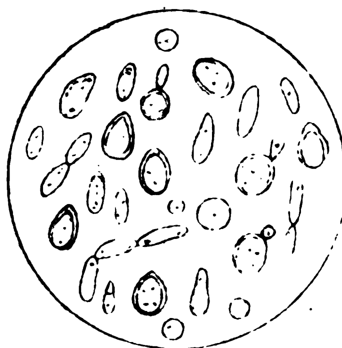
a



f



b



V



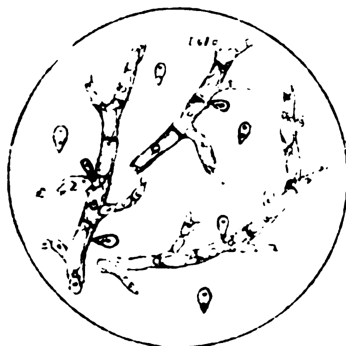
c

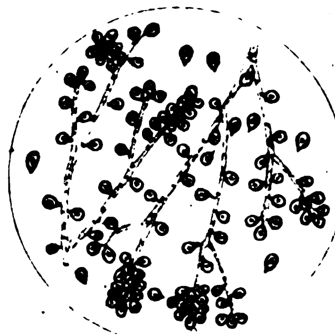


e



d





Istituto d'igiene della R. Università di Roma

Otto vibrioni isolati nel lazzaretto di Camaran durante il pellegrinaggio mussulmano del 1906-1907

per il dott. CESARE ZONCHELLO.

Durante il pellegrinaggio mussulmano del 1906-1907, il dott. Delpino, direttore del lazzaretto di Camaran, ed io abbiamo esaminato l'acqua potabile di parecchi battelli e le feci di molti pellegrini ammalati, giacenti nell'ospedale centrale del lazzaretto, allo scopo di isolare e studiare i vibrioni eventualmente esistentivi. Questa ricerca ci parve tanto più importante, dopo la discussione suscitata l'anno scorso al Congresso di Berlino dalle comunicazioni di Kraus.

Fino al 1905 erano soltanto ritenuti come *veri vibrioni colerici* quelli che, accanto alle proprietà fondamentali del bacillo virgola, descritto da Koch (e prime fra esse la reazione indolnitrosa e l'azione patogena sugli animali), presentavano in modo indubbio la reazione agglutinante con un siero specifico, e il fenomeno di Pfeiffer.

Al ritorno dei pellegrini mussulmani dalla Mecca, nel 1905, furono isolati nel lazzaretto di El Tor, dall'intestino di pellegrini morti per malattie ordinarie e più specialmente per dissenteria, parecchi vibrioni, tra i quali, 6 presentarono i fenomeni dell'agglutinazione e di Pfeiffer, per cui il Consiglio dell'amministrazione sanitaria quarantenaria e marittima di Alessandria d'Egitto dichiarò il pellegrinaggio infetto.

Ma una grave obbiezione d'ordine epidemiologico sorgeva contro questa conclusione: perchè essendo presente nell'intestino di un gran numero di pellegrini il vero vibrione di Koch, non si era sviluppato il colera in mezzo

a una sì grande agglomerazione di persone? Il pellegrinaggio del 1905 era stato molto numeroso e si era compito in condizioni igieniche pessime, e ciò non ostante nè a la Mecca, nè a Djeddah, nè a El Tor si era osservato alcun caso di colera.

Kraus et Pribram, studiando più diligentemente i 6 vibrioni di El Tor, vi riscontrarono accanto alla agglutinazione e al fenomeno di Pfeiffer, la proprietà di dare in brodocultura una emolisina e una tossina dotate di grandissima virulenza, emolisina e tossina che Kraus non trovò mai in autentici vibrioni colerici. In base a ciò e alle considerazioni epidemiologiche esposte, egli concluse che sono solamente vibrioni colerici specifici quelli che, oltre a dare l'agglutinazione e il fenomeno di Pfeiffer, mancano della emolisina e della tossina virulenta, solubile, secreta, diversa dalla endotossina di Pfeiffer nei veri vibrioni di Koch. Nella discussione che seguì alla comunicazione di Kraus fatta al Congresso di Berlino, Gotschlich, Pfeiffer, Gaffky furono decisamente contrari alle vedute di Kraus. Gotschlich si domandò se la nuova proprietà di produrre emolisina, nei veri vibrioni di Koch non potesse essere considerata come una mutazione nel senso di de Vries (mutazione che anche il Grüber aveva già osservata a proposito della mancata liquefazione della gelatina in uno stipite di *Vibrio Finkler et Prior*). Gaffky accennò ad esperienze di Kolle, da cui risulterebbero delle differenze nella produzione della emolisina e tossina in uno stesso stipite, e concluse che quei vibrioni sospetti che dànno in modo evidente l'agglutinazione e il fenomeno di Pfeiffer, come i 6 stipiti di El Tor, devono essere considerati vibrioni colerici anche se dànno emolisina e tossina solubile.

Recentemente Neufeld e Haendel hanno con prove di fatto confermata la supposizione del Gaffky, dimostrando che stipiti di vero *V. cholerae asiaticae* possono produrre emolisine, dimostrabili sia col metodo dei tubetti, sia con quello delle piastre.

La questione meritava quindi nuovo contributo di fatti e una serie più estesa di osservazioni. Per questo Delpino ed io intraprendemmo le nostre ricerche, per quanto nè durante il viaggio dei pellegrini, nè durante il periodo quarantenario non fu mai osservato alcun caso, nemmeno sospetto, di colera.

Fu esaminata l'acqua di 10 battelli e in 2 di essi noi isolammo dei vibrioni, cioè: nel *sambouk Dawlati*, provvisto di acqua dello Zanzibar, e nel *vapore Savoia*, proveniente da Bassorah e provvisto di acqua del fiume Chat-el-Arab. In 69 esami di feci di pellegrini, 6 volte trovammo dei vibrioni e cioè:

N. 78: pellegrino buckara, affetto da catarro intestinale cronico: guarito.

N. 125: donna indiana, affetta da malaria: guarita.

N. 127: pellegrino indiano, affetto da polmonite: morto.

N. 140: pellegrino indiano, affetto da bronchite acuta: guarito.

N. 141: pellegrino afgano, affetto da broncopolmonite: morto.

N. 158: pellegrino indiano, affetto da bronchite acuta: guarito.

Gli otto vibrioni isolati furono da me studiati nell'Istituto d'igiene dell'Università di Roma.

Nella seguente tabella riassumo di ciascuno di essi le principali proprietà morfologiche, culturali e biologiche.

Dallo studio dei vibrioni isolati, risulta come 5 fra essi (125, 127, 140, 158 e Savoia), già per il solo fatto della mancata fluidificazione della gelatina e della nessuna azione patogena per la cavia, sono da considerarsi come vibrioni banali, da mettersi accanto ai vibrioni non fluidificanti del Sanarelli, del Nicolle, di Zia Effendi, del Tiraboschi. Gli altri 3 vibrioni invece (78,141, Dawlati) per i loro caratteri morfologici, culturali e biologici si comportano come il vibrione del colera asiatico: essi fluidificano la gelatina per infissione in modo caratteristico, dànno in gelatina colonie caratteristiche, coagulano il latte (quantunque la coagulazione del latte non sia una proprietà constante del V. di Koch), dànno la reazione del triptofane. Tra di essi solo il n. 78 non dà la reazione dell'indolo, ciò che del resto non è sufficiente ad escludere che si tratti di un vero vibrione di Koch; anche il vibrione isolato da Fränkel nel 1892 a Duisburg, pur essendo, a giudizio di Koch, un vero vibrione colerico, non presentava la reazione dell'indolo: del pari il *Vibrio romanus* di Celli e Santori, produsse indolo solo alcun tempo dopo l'isolamento. Di più i 3 vibrioni Dawlati, n. 78 e n. 141, sono patogeni per le cavie, che essi ammazzano col reperto anatomo-patologico caratteristico del vibrione di Koch. Si tratta dunque di *vibrioni similcolerici*, che meritavano uno studio più completo per escludere o no che si trattasse di veri vibrioni colerici.

Procedei quindi a una più perfetta identificazione per mezzo dell'agglutinazione, del fenomeno di Pfeiffer, della ricerca dell'emolisina.

Agglutinazione. — Il siero agglutinante è stato fornito dai laboratori sanitari dello Stato: è di capretto, del marzo 1906, ha un titolo 1:20000. Ho adoperato esclusivamente culture in agar di 18 ore, emulsionate in soluzione fisiologica di Na Cl al 0.85 %. Ho usato per ogni vibrione i rapporti di: 1:500, 1:1000; 1:2000, 1:4000, 1:6000, 1:7500.

Nessuno dei tre vibrioni in esame diede la reazione agglutinante positiva, mentre questa fu netta e rapida a tutte le diluizioni in un vibrione colerigeno di Prussia della collezione dell'Istituto adoperato per controllo.

Questo esito negativo però non mi poteva, per sè solo, fare concludere che i tre vibrioni studiati non erano colerici. Ricordo che studi fatti su veri bacilli del tifo hanno dimostrato che alcuni stipiti possiedono la proprietà di essere agglutinati appena isolati dall'organismo animale, ma la perdono attraverso i passaggi nei terreni di coltura e la riacquistano con le iniezioni negli animali, mentre altri stipiti presentano tale proprietà nei terreni di cultura, e la perdono in seguito alle iniezioni in animali. Le osservazioni del Sacquépée sul

bacillo di Eberth, del Zirolia e dell'Hankin sul vibrione colerico sono dimostrative a questo riguardo.

Fenomeno di Pfeiffer e battericidia. — Ho adoperato un siero specifico di capretto fornito dai laboratori di sanità dello Stato col titolo gr. 0.0002. La prova in vivo non diede alcun risultato concludente, a causa della poca virulenza dei germi, epperciò ricorsi alla prova *in vitro*, seguendo letteralmente la tecnica consigliata da Bordet, nel suo lavoro « Les leucocytes et les propriétés actives du serum chez les vaccinés », pag. 492 degli *Annales de l'Institut Pasteur*, volume IX, anno 1895. Secondo Bordet la prova *in vitro* equivale alla prova classica di Pfeiffer nelle cavie.

Con sorpresa ho constatato che i tre vibrioni colerasimili di Camaran diedero sempre evidentissima la disgregazione granulare tanto nello esame a goccia pendente, quanto nelle preparazioni colorate: il fenomeno fu anche positivo con la diluizione del siero specifico 1 : 10. Ma anche gli altri cinque vibrioni banali diedero nella stessa prova lo stesso risultato, e del pari positivo fu il fenomeno della disgregazione granulare sostituendo al siero di capretto specificamente battericida, il siero di capretto normale, della stessa età del siero specifico. Evidente quindi la conclusione che il fenomeno della disgregazione granulare da me osservato negli 8 vibrioni, seguendo la tecnica del Bordet, era un effetto dell'azione batteriolitica del siero di sangue di capretto, adoperato a così forti concentrazioni (1 : 2, 1 : 10). Epperciò ricorsi alla prova della battericidia *in vitro* con il metodo delle piastre tenendo conto del numero delle colonie sviluppatesi dopo il contatto dei vibrioni col siero specifico.

Ho usato per ciascun vibrione tre diluizioni di siero 1 : 500, 1 : 1000, 1 : 2000. Ecco la tecnica seguita: Si inattiva il siero specifico tenendolo a 58° per un'ora. Si preparano per ciascun vibrione tre tubetti, contenenti ciascuno 0.9 di soluzione fisiologica Na Cl al 0.85%, 0.1 del siero allungato in modo da avere una delle tre diluizioni suddette, e un'ansa normale della patina in agar del germe, di 20 ore di sviluppo. Si mettono i tre tubi ed i tubi di controllo per 2 ore nel ghiaccio. Poi si aggiunge a ciascun tubo il complemento (gr. 0.02 di siero freschissimo di cavia normale) e si mettono i tubetti a 37°.

In questa prova sono necessari almeno due controlli, uno per stabilire la quantità di germi seminati, l'altro per determinare un eventuale potere battericida del siero di cavia.

Ogni due ore si allestiscono le piastre. Per questo un'ansa normale del liquido di ciascun tubetto si semina in un altro tubo contenente 1 cmc. di soluzione fisiologica, perchè la maggior diluizione

renda più facile la conta delle colonie, ed un'ansa normale di questa diluizione si semina in 10 cmc. di agar fluidificato, e si fanno le piastre. Dopo 24 ore di termostato si procede alla conta delle colonie a occhio nudo e armato d'una lente.

Nessuno dei tre vibrioni colerasimili di Camaran presentò il fenomeno della battericidia: tutte le scatole di Petri fatte per ciascun vibrione (diluizioni 1 : 500, 1 : 1000, 1 : 2000 e due controlli, a diverse ore di termostato) dimostrarono un numero di colonie presso a poco uguale. Al contrario la prova fatta col vibrione colerico dell'Istituto fu nettamente positiva.

Ricerca dell'emolisine. — Io ho sottoposto alla *prova dell'emolisi* gli 8 vibrioni di Camaran, e naturalmente il vibrione colerico dello Istituto (V. di Prussia). Non ho seguito la tecnica indicata da Kraus, cioè l'osservazione del fenomeno emolitico in piastre di agar sangue di capra o di montone, perchè questo processo, nei lavori fatti dalla Amministrazione quarantenaria d'Egitto, si è mostrato incostante nei suoi risultati e talora di non facile apprezzamento. Ho studiato quindi il fenomeno nei tubetti da siero-diagnosi. In ciascuno di essi mettevo cmc. 0.9 di soluzione fisiologica, 0.1 di emulsione in soluzione fisiologica della patina su agar di 20 ore, e una goccia di globuli rossi di bue, ben lavati; in una seconda serie di prove ho sostituito all'emulsione della patina cmc. 0.1 di una brodocultura di 2 giorni, e al sangue di bue quello di coniglio. Nell'un caso e nell'altro l'emolisi fu positiva e completa già dopo 2 ore nei vibrioni Dawlati, n. 141, meno positiva o appena marcata nel vibrione n. 78, che invece la diede manifesta e completa dopo 24 ore. Gli altri 5 vibrioni banali di Camaran e il vibrione colerico dell'Istituto non presentarono alcuna traccia di emolisi.

Da tali ricerche risulta che i tre vibrioni, che per i loro caratteri morfologici e culturali e per importanti caratteri biologici, si comportano come il vero vibrione colerico, non si possono però considerare come autentici vibrioni di Koch, non essendo agglutinati, nè batteriolizzati da siero specifico; nè, pur producendo emolisine, possono essere messi nel gruppo dei 6 vibrioni di El Tor.

I vibrioni di El Tor si distinguono in due gruppi: uno composto di 6 stipiti che si agglutinano e dànno il fenomeno di Pfeiffer se trattati con immunsiero colerico, ma che per produrre emolisine e tossine, non vennero da Kraus considerati come veri vibrioni colerigeni; un secondo gruppo consta di 30 vibrioni che, come i nostri 3, morfologicamente e per i più importanti caratteri biologici, si comportano come il vibrione di Koch, ma non sono agglutinati dal siero spe-

cifico, non dànno la reazione di Pfeiffer e producono, come il primo gruppo, emolisine e tossine molto virulenti. E' probabilmente fra questi trenta vibrioni che i tre vibrioni di Camaran devono essere collocati.

Ma non possedendo alcuno dei sei stipiti dei vibrioni di El Tor appartenenti al primo gruppo, non ho potuto vedere se l'antitossina prodotta da questi fosse capace di neutralizzare l'emolisina e la tossina dei tre vibrioni di Camaran, come, secondo Kraus, neutralizza l'emolisina e la tossina dei 30 altri vibrioni di El Tor.

Rimane intanto confermato il fatto, osservato anche da Crendiropoulo, che i vibrioni colerasimili, che non presentano insieme i fenomeni dell'agglutinazione e della battericidia, sono dotati di proprietà fortemente emolizzanti.

Sarà cosa di molta importanza scientifica e pratica, in ispecial modo per le misure profilattiche da prendersi durante i pellegrinaggi mussulmani, studiare il rapporto che intercede fra questi vibrioni, il vero vibrione colerigeno e i sei vibrioni di El Tor, allo scopo di stabilire se si tratta di specie diverse, di modificazioni accidentali dovute all'ambiente, oppure di mutazioni nel senso di De Vries.

Conclusioni.

1° Di otto vibrioni isolati nel Lazzaretto di Camaran durante il pellegrinaggio mussulmano, 1906-1907, solo tre si possono considerare come colerasimili, per i loro caratteri morfologici, culturali e biologici e per la loro azione patogena; ma non possono essere considerati come veri vibrioni del colera asiatico, perchè non sono agglutinati, nè batteriolizzati da siero specifico.

2° Questi tre vibrioni presentano, al pari di tutti i colerasimili, non agglutinati da sieri specifici, e non reagenti al fenomeno di Pfeiffer studiati finora dagli AA., un forte potere emolizzante.

3° Con ogni probabilità essi devono essere collocati nel gruppo dei trenta vibrioni di El Tor, vibrioni emolitici, non agglutinati e non uccisi da sieri specifici.

LAVORI CITATI.

1. Bordet. *Les leucocytes et les propriétés actives du serum chez les vaccinés*. Annales de l'Inst. Pasteur, IX, 1905.
2. Celli e Santori. *Il colera in Roma nel 1893*. Questi annali, IV, 1894, p. 244.
3. Crendiropoulo. *Rapport sur le Diagnostic des Vibrions*. Alexandrie, 1906.
4. Fraenkel. *Nachweis der Cholerabacillen im Flusswasser*. Deutsche med. Wochenschr., 1892, p. 925.
5. Gotschlich. *Ueber Cholera und choleraähnliche Vibrionen unter den aus Mekka zurückkehrenden Pilgern*. Zeitschrift. f. Hygiene, LIII, 1906, p. 281.
6. Id. *Rapport sur les recherches bactériologiques pratiquées au campement quarantenaire de El Tor (1906)*. Alexandrie, 1906.
7. Kraus u. Prantschoff. *Zur Differenzierung des Choleravibrio von choleraähnlichen Vibrionen mittels Hämotoxinen und der Blutagarplatte*. Wien. klin. Wochenschr., 1906, n. 11.
8. Id. id. *Ueber Identität der Hämotoxine und der Toxine der Vibrionen sowie deren Antitoxine*. Centralbl. f. Bakterius. Orig. I Abt., XLI, 1906.
9. Kraus u. Pribram. *Ueber die Beziehungen der Vibrionen El Tor zu dem Cholera Vibrio*. Centralbl. f. Bakteriol. Orig. I Abt. XLI, 1906.
10. Neufeld u. Haendel. *Beitrag zur Beurteilung der El Tor-Vibrionen*. Arbeiten aus dem kaiserl. Gesundheitsamte, XXVI, p. 536, 1907.
11. Nicolle. *Le Cholera à Constantinople depuis 1893*. Annales de l'Inst. Pasteur, 1896, p. 86.
12. Sacquépée. *Variabilité de l'aptitude agglutinative du bacille d'Eberth*. Annales de l'Inst. Pasteur, 1901.
13. Sanarelli. *Les Vibrions des eaux et l'étiologie du Cholera*. Annales de l'Inst. Pasteur, 1903, p. 693.
14. *Tagung der freien Vereinigung für Mikrobiologie*. Berlin, 1906. Centralbl. f. Bakt. Ref. 1906, Bd. XXXVIII.
15. Tiraboschi. *I Vibrioni dell'acqua potabile di Genova*. Bollettino della R. Accad. medica di Genova, 1905, p. 15.
16. Zia-Efendi. *Note sur un Vibrion cholérique anormal*. Annales de l'Institut Pasteur, X, 1896, p. 92.
17. Zirolia. *Note sur six vibrions isolés des eaux de navires à Port-Said*. Alexandrie, 1906.

Istituto d'igiene della R. Università di Roma

Ricerche dei germi anaerobi nelle suppurazioni

per il dottor V. GAUDIANI.

(Con la tavola XVII)

Piano delle ricerche.

Il tema propostoci (1) era quello di ricercare i germi anaerobi nelle suppurazioni, sia che presentassero oppur no il carattere fetido. Malgrado la vastità del campo e le difficoltà delle ricerche, abbiamo potuto studiare batteriologicamente 30 casi di suppurazione, i cui risultati esponiamo qui appresso.

Per la raccolta del materiale morboso, ci siamo rivolti ai diversi reparti degli Ospedali di Roma; alcuni dei casi da noi studiati, sono osservazioni personali di ammalati capitati nel nostro reparto chirurgico dell'Ospedale di Sant'Antonio.

Quasi sempre, il materiale veniva raccolto con cucchiai da raschiamento sterilizzati alla fiamma, o con siringhe di Tursini, nel momento in cui si praticava l'operazione chirurgica. Solo una volta, in un malato morto rapidamente, il materiale da studio, fu raccolto all'autopsia circa 20 ore dopo la morte. Uno dei campioni di pus, fu inviato al nostro Istituto d'igiene dal dott. Piroli, tenente medico di guarnigione all'isola di Candia. Lo stesso collega ci fornì gentilmente una esatta storia clinica che più appresso riprodurremo: a lui esprimiamo in questo punto i nostri più vivi ringraziamenti.

Metodi adoperati.

Raccolto il pus, eseguivamo il più presto possibile l'esame microscopico e colturale. Ove per qualche ragione non si poteva subito eseguirlo, il materiale veniva conservato in refrigerante. Prima di fare le colture, per l'isolamento si praticava costantemente l'esame microscopico diretto. A tale

(1) Tesi di libera docenza in Patologia chirurgica.

scopo ci servivamo ordinariamente di un preparato colorato con la fucsina, uno colla thionina fenica, uno col metodo di Gram Naturalmente era nostra cura di tener conto del numero e della forma dei germi contenuti nel preparato, per poi metterli in confronto con quelli ottenuti dalle colture.

Per tutti i casi costantemente abbiamo praticato colture aerobiche ed anaerobiche.

Per le colture aerobiche facevamo le semine in agar in capsule di Petri che tenevamo per due o tre giorni a 37° C.: esaminavamo microscopicamente le colture sviluppate, cercando di avvicinare a qualche tipo i germi riscontrati, avendo noi lo scopo di studiare solo i germi anaerobici. Nella esposizione dei casi studiati, ci limiteremo perciò a descrivere dettagliatamente solo i casi, in cui le ricerche furono positive per i germi anaerobici. Gli altri casi negativi ci limiteremo solo a citarli.

Contemporaneamente alla semina in terreni aerobi, praticavamo la semina col metodo anaerobico.

I metodi da noi usati, sono stati quelli di Roux; quello per agitazione e diluizione (Sanfelice), una volta quello di Vignal: ci siamo però presto convinti che quello degli alti strati bastava allo scopo ed abbiamo abbandonato gli altri, anche per la ragione che per eseguirli occorreva un tempo maggiore.

L'isolamento su piastre l'abbiamo tentato solo alcune volte, mettendole nei comuni essiccatori e sottraendo l'ossigeno per mezzo della pompa ad acqua e del pirogallato potassico. I nostri tentativi sono stati infruttuosi, come d'altronde è successo a molti autori, e noi, contenti del metodo degli *alti strati*, ci siamo assolutamente attenuti ad esso. Non ci par fuor di luogo fermarci su questo metodo, il quale a noi sembra il più semplice e nell'istesso momento il più corrispondente allo scopo, anche per il fatto che esso è sorto, or è molti anni, nel nostro Istituto per opera del Sanfelice.

Il metodo del Sanfelice è realmente assai semplice e comodo e presenta notevoli vantaggi su altri. Esiste una differenza essenziale fra questo metodo e quello del Liborius, con cui dai più è ricordato. Sanfelice fin dal 1891 ne pubblicò la descrizione, mettendo in rilievo alcune particolarità del suo metodo. Usando l'agar o la gelatina con aggiunta di sostanze riducenti, egli si serviva di comuni provette che contenevano un cilindro di materiale nutritivo, la cui altezza era di 8-10 centimetri; mentre Veillon e la sua scuola hanno in seguito consigliato cilindri di agar molto più alti. Sanfelice introdusse il rapido raffreddamento dopo la semina, allo scopo d'impedire che si sciogliesse altro ossigeno dell'aria, usando a preferenza terreni di recente preparati. Noi, edotti dall'esperienza degli altri, abbiamo sempre esposto il terreno prima della semina, ad una lunga ebollizione. Del resto, abbiamo praticato il metodo, precisamente come lo eseguiva il Sanfelice. Abbiamo usato terreni glucosati o al formiato sodico o alla glicerina; tutti hanno corrisposto bene.

Allo scopo di riuscire facilmente nell'isolamento, abbiamo sempre allestito un gran numero di diluizioni, sia nelle provette che nelle pipette di Roux. Secondo la ricchezza e varietà di germi che si osservavano al microscopio eseguivamo un numero maggiore o minore di diluzioni. Quando i germi erano scarsi, ci limitavamo a praticare tre diluizioni. Quando il pus

appariva molto ricco si diluiva prima il materiale in brodo e poi da questo si seminava in 4-5, fino a 8 tubi.

***

Studiando la flora anaerobica, ed avendo una esatta conoscenza dell'esperienza altrui, ci siamo convinti che la reale difficoltà per l'isolamento dei germi anaerobici sono di due ordini.

Una consiste nel fatto che alcuni germi anaerobici hanno una scarsissima vitalità e che già al secondo o terzo passaggio muoiono. L'altra consiste in ciò che questi germi sono spesso accompagnati da altri aerobi facoltativi, che si sviluppano bene e rapidamente in anaerobiosi, pigliando il sopravvento sugli altri. Fra questi germi anaerobici facoltativi, ricordiamo il *B. coli*, i *protei*, i *cocchi*, *ecc.* Ove noi ci trovassimo sempre in presenza di germi sporigeni molto resistenti alle alte temperature, sarebbe facil cosa sbarazzare il campo, esponendo le colture o il pus ad una temperatura a cui i germi asporigeni perissero, secondo il metodo consigliato da Hintchmamm e Lindenthal, Silberschmidt, Rodella ed altri. Ma, purtroppo, questo metodo dà sovente risultati negativi, giacchè molti anaerobi con o senza spore, non resistono alle temperature in cui i comuni germi cessano di vivere.

Allo scopo di far perire le specie meno resistenti, noi abbiamo alcune volte usato il seguente metodo che può spesso dare dei buoni risultati. Facevamo la semina in brodo, in un tubo di Gruber oppure in una provetta strozzata alla fiamma, servendoci però di molto materiale. Indi, praticavamo in essa il vuoto per un tempo non minore di mezza ora chiudendo dopo la provetta alla fiamma ed esponendola al termostato per un tempo variabile dai dieci ai trenta giorni. All'epoca stabilita si apriva il tubo e si faceva la semina col metodo del Sanfelice. In uno dei nostri più importanti casi di peritonite da perforazione del sigma colico, in cui la grande abbondanza di germi, fra i quali il *B. coli*, non ci aveva permesso l'isolamento di alcun anaerobio, con l'applicazione di questo metodo potemmo isolare facilmente un anaerobio asporigeno dotato di potere patogeno. Questo modo di procedere si basa naturalmente sul fatto che, in un ambiente anaerobico, i germi aerobi stretti ed i facoltativi meno resistenti debbono perire dopo un certo tempo, per cui nell'isolamento si avrà a fare con un numero minore di specie batteriche. Dobbiamo però subito dire che in cinque altri casi, in cui abbiamo adoperato questo metodo, non abbiamo avuto alcun risultato positivo; e però non è un metodo di applicazione generale.

Eseguite le semine, noi tenevamo i tubi in termostato a 37° per circa 6 giorni, aspettando che *possibilmente tutte le specie* fossero sviluppate prima di procedere all'isolamento, che da noi era così praticato.

Giunto il momento opportuno, per procedere alla pesca delle colonie sviluppate si estraeva anzitutto il cilindro di agar dalla provetta, raccogliendolo in una capsula di Petri sterilizzata. A tal fine, tolto il tappo di cotone della provetta e passato l'orlo di questa alla fiamma, se ne intro-

duceva la bocca fra le due metà della capsula, tenuta con la mano sinistra, mentre con la destra si reggeva la provetta per mezzo di una pinza di legno a pressione. Si riscaldava allora, con manovra rapida ed accorta, la provetta in tutta la sua lunghezza e per tutto il suo contorno, in modo da fluidificare appena un sottil velo cilindrico di agar subito al di sotto del vetro: a questo punto si presentava alla fiamma il fondo della provetta, di maniera che, per la forte dilatazione della poca aria ivi raccoltasi, il cilindro di agar fosse respinto e sollecitato a scivolare nella capsula. Ciò fatto, si tagliava il cilindro, con coltello arroventato, in sottili dischi, avendo cura di risterilizzare lo strumento ad ogni taglio. Le colonie presenti in ciascun disco venivano pescate con ago di platino, secondo le solite regole tecniche. Tali colture d'isolamento si facevano per infissione in agar, che si ricopriva con altro strato d'agar, secondo il metodo Liborius ed Hesse.

Dopo che si era ottenuto lo sviluppo nella infissione, prima di procedere oltre si verificava se la coltura era, oppur no, pura. Nel caso negativo, si procedeva ad un nuovo isolamento. Nel caso positivo, si verificava se il germe era anaerobio stretto oppur no. A tal uopo si eseguivano semine per strisciamento su due o tre tubi di agar. In caso di sviluppo, tralasciavamo di occuparci di esso, curandoci solo di studiarne la forma ed il tipo.

Quando invece si assodava che il germe apparteneva agli anaerobi stretti, se ne eseguiva lo studio morfologico, ricercandone poi l'azione patogena.

Ricordiamo a questo punto che le colture in mezzi liquidi erano da noi praticate dopo aver fatto lungamente bollire il brodo a bagnomaria. Eseguita la semina, si sovrapponeva alla coltura un alto strato di olio sterile. I risultati così ottenuti sono stati buoni per quasi tutti i germi da noi studiati. Le gelatine a 37° venivano ricoperte di agar.

Quale materiale da iniezione ci siamo serviti a volta di colture in mezzi liquidi, a volta abbiamo diluito le infissioni in agar in liquidi sterili; ciò specialmente quando lo sviluppo era molto abbondante.

Per tutti i germi da noi studiati ci siamo anche serviti della coltivazione aerobica, sia usando i terreni di Harras, formati con poltiglia di fegato, sia dei terreni di Wrzoseck-Ori, contenenti un pezzo di patata.

Per la preparazione della poltiglia di organi abbiamo esattamente eseguita la descrizione di Harras, servendoci del fegato di vitella. Il materiale veniva distribuito in matracci e da questi al momento della semina in provette. Siccome in tal modo avvenivano inquinamenti, abbiamo in seguito preferito sterilizzare il materiale nelle comuni provette.

Per il terreno di Wrzoseck, abbiamo fatto preparare dei brodi in fiaschi o in provette contenenti pezzi di patata che venivano sottoposte ad una sterilizzazione di 120 gradi. Abbiamo anche noi notato che nei palloni contenenti gran quantità di brodo ed un piccolo pezzo di patata, lo sviluppo avveniva o stentatamente o mancava affatto.

Tutti i germi da noi studiati hanno conservato la loro virulenza in questi terreni.

Ricerche.

I. — Suppurazione degli organi genitali femminili.

Abbiamo avuto occasione di esaminare solo pochi casi.

Endometrite puerperale. — Tre casi di endometrite puerperale contrassegnate coi numeri 3, 5, 2? del nostro protocollo, sono state da noi studiate batteriologicamente. Nessuna di esse aveva un carattere putrido spiccato. Si trattava di casi non gravi, che guarivano rapidamente.

In tutti tre i casi abbiamo isolato solo germi aerobi rappresentati da cocchi, *B. coli* ed altri batteri dello stesso tipo.

II. — Suppurazione post-operatoria di origine genitale.

Questo caso segnato col numero 18 è uno dei più importanti. Le ricerche dei germi aneorobi sono state positive.

Notizie cliniche. — B..... D......, di anni 43, accolta nell'ospedale di San Giovanni il 5 marzo 1906. Niente dal lato anamnestico. Da vari anni soffre di metroragia. Ricoverata direttamente nel reparto chirurgico, dove le si riscontra un tumore addominale.

Alla ispezione notasi una tumefazione che occupa la metà destra dell'addome e che ha limiti indistinti. Si continua in basso anche verso la linea mediana con un'altra di volume più piccolo. La palpazione dell'addome e l'esplorazione vaginale fa notare che la tumefazione mediana fa corpo coll'utero, la seconda è a questa unita mediante un peduncolo. I due tumori sono mobili.

Diagnosi clinica. — Mioma dell'utero.

Operazione. — Isterectomia addominale sub-totale. Sutura parziale dell'addome, drenaggio del peritoneo.

Decorso. — Dopo l'operaziane si manifestò un'elevazione termica che nei primi quattro giorni arrivò fino a 37°.7 C.

L'ammalata ebbe ripetutamente vomito, si lagnava di forti dolori addominali. Il drenaggio fu allontanato in quarta giornata. La febbre continuò ad oscillare fra i 38°.7 C. e 37°.2 C. Dopo qualche altro giorno si scoprì una tumefazione nel fornice laterale di destra che andò ingrandendosi fino a raggiungere l'eltezza della spina iliaca anteriore superiore. Questa tumefazione si estendeva anche verso il fornice di destra. Presto si riscontrò la fluttuazione; la percussione però in corrispondenza di essa dava un suono nettamente timpanico. La puntura esplorativa del fornice fece riscontrare la presenza di pus fetido. Il 20 ottobre il fornice sinistro fu aperto per via vaginale. Malgrado ciò, la tumefazione in corrispondenza della fossa iliaca destra non scomparve e la febbre continuò ad avere lo stesso decorso. Il 3 ottobre, cioè 27 giorni dopo la prima operazione, si procedette al vuotamento della raccolta, mediante una incisione al di sopra del legamento di Poupart. Fuoriuscì una grande quantità di gas e di pus molto fetido. La temperatura ritornò al normale, e l'ammalata guarì rapidamente nello spazio di circa un mese.

Ricerche batteriologiche.

Esame microscopico del pus. — Con un preparato alla thionina fenica notavasi: cocchi variamente aggruppati; bacilli di diversa grandezza e forma, alcuni piccoli ad estremi arrotondati, altri un po' più grossi. Assenza di spore. Col Gram restavano colorati i cocchi ed alcuni bacilli.

Colture aerobiche. — Si isolarono i seguenti germi aerobici: 1° *Stafilococco albo*; 2° *Bacterium coli*; 3° Un bacillo del gruppo del *subtilis*.

Colture anaerobiche. — Furono praticate contemporaneamente col metodo di Liborius-Sanfelice e con quello di Roux. Con entrambi i metodi si ebbe un abbondante sviluppo di gas. Dopo vari passaggi riuscimmo ad ottenere allo stato di cultura pura un bacillo strettamente anaerobio.

Caratteri morfologici. — E' un bastoncino lungo da 3.20 a 4.80 μ largo circa 0.70. Mostrasi spesso isolato, ha gli estremi arrotondati, talvolta è leggermente ricurvo, tal altra si presenta in catene di vari elementi, raramente forma filamenti (v. Tav. XVII, fig. 1ª). Si colora bene con i colori di anilina, qualche volta assume una colorazione fragmentaria. Positivo al Gram. Non ha capsula. E' immobile (osservato su vetrino di Prazmowski). Non ha ciglia vibratili.

Caratteri colturali. — *Per agitazione*: in agar zuccherato le colonie cominciano a svilupparе a 37° C. dopo circa 48 h. Colonie bianco grigiastre, lenticolari. Crescono solo in profondità. Assenza di odori caratteristici.

Per infissione (alto strato) si sviluppa sotto forma di nastrino molto delicato. A 22° C. lo sviluppo è molto più lento e meno appariscente.

In gelatina a 22: le infissioni mostrano queste caratteristiche: sviluppo lungo tutta la infissione. Nel tratto superiore è squamoso, nell'inferiore a coroncina. Nel superiore si distinguono corte propaggini a spazzola parallele e perpendicolari alla infissione. Lo sviluppo comincia dopo tre giorni. Non dà liquefazione.

In gelatina a 37° C. (anaerobiosi) si ha un delicato intorbidamento.

Il germe cresce egualmente in agar glicerinato, al formiato sodico, senza produrre gaz. Più stentatamente cresce pure in agar semplice.

In brodo (anaerobiosi) lievissimo intorbidamento, dopo parecchi giorni, deposito polverulento sul fondo.

In latte: formazione di un coagulo dopo 5-6 giorni, che però non si ridiscioglie. Si deposita al fondo dopo parecchi giorni.

In poltiglia di fegato, in brodo con patata cresce abbondantemente.

Azione patogena.

PRIMO ESPERIMENTO. — Due cavie n. 1 e 2 si iniettano ciascuna con cmc. 3 di brodocoltura di 4 giorni, la prima nel sottocutaneo, la seconda nel peritoneo.

Cavia n. 2 muore dopo 8 ore. Riscontrasi alla sezione eseguita dopo poche ore, una intensa iperemia del peritoneo, scarsissimo essudato torbido. Nel sottocutaneo edema gassoso. All'esame microscopico dell'essudato

riscontrasi un bacillo che corrisponde per i caratteri a quello iniettato. Assenza di bacilli nel sangue. Colle colture dell'essudato si ottiene il germe stesso insieme a cocchi (inquinamento).

Cavia n. 1. Mostrasi abbattuta dopo l'iniezione. Si osserva una vasta infiltrazione del sottocutaneo.

Necrosi della pelle, formazione di escara che si elimina dopo qualche giorno. Morte in sesta giornata.

Alla sezione notasi nella regione addominale una perdita di sostanza a fondo grigio sporco. Niente di notevole negli organi interni. All'esame microscopico dell'essudato dell'ulcera, bacilli e cocchi. Assenza di bacilli nel sangue e negli organi

Secondo esperimento. — Si iniettano due conigli: coniglio n. 1 con 3 cmc. di brodocoltura di 4 giorni nel peritoneo.

Coniglio n. 2. La stessa quantità nel sottocutaneo. Questo muore dopo tre giorni. Riscontrasi alla sezione una infiltrazione ematico-purulenta nel sottocutaneo. Essudato sieroso nel peritoneo. Molto numerosi bacilli nell'essudato del sottocutaneo e nel sangue del cuore.

Coniglio n. 1. Morto dopo 4 giorni. Essudato sieroso-torbido nel peritoneo, che mostrasi molto iperemico. Varie chiazze fibrino-purulente. Niente altro di notevole negli organi interni. L'esame microscopico fu positivo per l'essudato, negativo per il sangue e per gli organi interni.

Notiamo qui, che le colture si andavano rapidamente attenuando tanto che dopo circa 20 passaggi non si riusciva ad uccidere la cavia che dopo 5 giorni. Quelle ottenute dall'essudato della cavia si mostravano alquanto più efficaci.

Terzo esperimento. — Iniezione del bacillo insieme allo stafilococco aureo. Ci siamo serviti di una coltura di stafilococco che uccideva un coniglio adulto dopo 24 ore nella dose di 3 cmc. di brodocoltura iniettata nel peritoneo. Una cavia è stata iniettata a scopo di controllo col solo stafilococco nella dose di 3 anse Due cavie hanno avuto contemporaneamente un'iniezione di 3 cmc. di brodocultura del bacillo anaerobio, più 3 anse di stafilococco. Le colture del bacillo erano molto vecchie e non avevano più alcuna efficacia. Le due cavie così iniettate morirono prima di 24 ore. La cavia iniettata col solo stafilococco non mostrò alcuna reazione. L'autopsia delle due cavie morte mostravano quanto segue:

La regione addominale e pettorale appariva molto rigonfiata, alla palpazione notavasi un pastosità diffusa a tutta la regione, senza gaz. Incisa la pelle sgorgava una grande quantità di liquido sieroso emorragico che infiltrava tutti i tessuti e si estendeva quasi fino al dorso. I muscoli erano molto rossi e spappolati. Nell'addome non esisteva essudato: le capsule surrenali ed i reni erano molto iperemici. L'esame microscopico dell'essudato fu positivo, i cocchi apparivano in più grande quantità.

Quarto esperimento. — Praticate colture in brodo in grande quantità furono filtrate dopo 20 giorni o dopo 3 giorni. Due cavie iniettate con i filtrati di coltura di 3 giorni, rispettivamente con 3 cmc. e 5 cmc., morirono dopo 3-4 giorni. Una cavia iniettata con 5 cmc. dei filtrati di 20 giorni sopravvisse. Alla sezione delle cavie morte si riscontrò solo una notevole iperemia del sottocutaneo.

Epicrisi.

La raccolta marciosa, sviluppatasi in seguito alla miomectomia, si era estrinsecata specialmente nel parametrio e nella fossa iliaca. Siccome l'operatore non scollò alcuna aderenza intestinale, nè lese l'intestino, abbiamo creduto classificarla fra le suppurazioni di origine genitale. Sappiamo infatti che il canale genitale della donna è molto ricco di germi anaerobii anche allo stato normale. E' probabile che nelle alterate condizioni dell'endometrio, come è il caso dei miomi uterini, la flora possa essere più ricca. Crediamo quindi che il germe del focolaio purulento provenga dal canal genitale. Siccome la raccolta marciosa aveva un carattere estremamente fetido e conteneva gran quantità di gas, è utile fermarsi un momento sulla distinzione che v. Schroetter propose fra ascesso gassoso e ascesso con gas. Egli intendeva comprendere nella prima categoria le raccolte provocate dalla contemporanea azione di germi piogeni e germi gassogeni, nel quale caso la formazione del gas sarebbe primaria. Nella seconda categoria voleva comprendere i casi in cui la formazione del gas avveniva solo secondariamente in seguito alla penetrazione dei germi gassogeni in un focolaio marcioso preesistente. A noi pare che questa distinzione, accettata anche da A. Sandler, se è giustificata dal punto di vista teoretico, non lo è certamente dal punto di vista pratico. Nel caso nostro si trattava evidentemente di un'infezione mista. Crediamo che non tutti i microrganismi siano stati da noi isolati, anche per il fatto che il germe anaerobio, che, come vedremo, non si identifica con alcuno dei germi noti (bac. B.), non produceva gas fetidi in coltura. La simbiosi batterica aveva fatto assumere al caso un andamento grave, ma l'intervento chirurgico, fece rapidamente scomparire i fenomeni generali. Possiamo così concludere che il germe che dava il caratteristico odore fetido probabilmente non fu da noi isolato.

III. — Suppurazioni delle vie urinarie.

Abbiamo studiato un caso di cistite purulenta (caso n. 4) in una donna affetta da paralisi vescicale e morta per lesioni cerebrali. Le ricerche per i germi anaerobii sono state negative.

2. *Due casi* di ascessi perinefritici. Anche in questi casi abbiamo isolato solo germi aerobii.

3. *Due casi* d'infiltrazione e suppurazione urinosa a decorso grave da noi personalmente operati.

Caso I (n. 19). *Notizie cliniche.* — N. N., di anni 50 è accolto nell'ospedale di Sant'Antonio il 5 ottobre 1906 per iscuria che dura da circa 24 ore. Si diagnostica una stenosi uretrale e si pratica l'uretrotomia interna. L'urina, fortemente alcalina, contiene gran quantità di pus e traccie di albumina.

Durante i primi giorni di degenza, ebbe febbre continua che arrivava fino a 39° c. In quinta giornata fu allontanato il catetere a permanenza. Da quel momento non potè emettere urine, e dopo poche ore si manifestò un'infiltrazione del perineo che si propagò rapidamente all'asta e all'addome. Dopo poche ore fu praticata una larga incisione perineale, fu aperta l'uretra e introdotta una siringa a permanenza in vescica. I tessuti erano necrotici e infiltrati di pus fetido. L'urina, contenente gran quantità di pus, aveva il medesimo odore. L'infermo morì rapidamente con sintomi setticoemici.

Autopsia (praticata dopo 24 ore). — La regione perineale e la regione soprapubica mostravano un colore grigio ardesiaco con diverse bolle contenenti icore fetido. Il sottocutaneo era infiltrato di pus. Niente di notevole all'esame degli organi interni. I reni mostravano un rigonfiamento torbido. Pelvi un po' dilatata, ureteri normali, cistite purulenta, stenosi uretrale.

Ricerche batteriologiche.

Esame microscopico del pus (raccolto all'operazione). — Con un preparato alla thionina fenica, notiamo una grandissima quantità di germi, fra cui cocchi riuniti in coppie, catenelle, ed in ammassi regolari. Forme bacillari, alcune tozze quasi elissoidi, altre snelle, altre lunghe e grosse. Col Gram si scolorano tutte le forme bacillari; restano colorati i cocchi.

Colture aerobiche. — Si isolano vari germi fra cui lo stafilococco aureo e il *bacterium coli commune.*

Colture anaerobiche. — Praticate coi metodi già accennati, ci hanno fatto isolare un bacillo anaerobio che appresso descriviamo.

Caratteri morfologici. — Bastoncino sottile, lungo da 3 a 4.50 μ, larghezza al di sotto di 0.50, per lo più isolato. Spesso filamenti che arrivano fino a 35 μ. Si colora con tutti i colori di anilina. Negativo al Gram, immobile. Non produce spore, non ha capsula. Le colture giovani mostrano più spesso la presenza di filamenti che non si hanno mai nelle culture in brodo. Nelle culture vecchie sono più numerose le forme isolate ed i filamenti corti mobili.

Caratteri culturali. — Per agitazione in agar zuccherato, le colonie cominciano a svilupparе a 37° c. dopo circa 36 ore, a 22° più tardi. Hanno forma rotonda, crescono verso il fondo e non hanno niente di caratteristico. Non superano la grandezza di una testa di spillo.

Infissione in agar zuccherato. — Cresce a guisa di nastrino molto delicato lungo tutta la infissione. Maggiore sviluppo verso il fondo. Assenza di gas.

Gelatina (semplice). — A 22° C. dà uno sviluppo specialmente in profondità. Le colonie crescono staccate e si contornano di un alone biancastro. Lo sviluppo comincia dopo le 24 ore. Non avviene la fluidificazione.

In gelatina glucosata. Gli stessi caratteri.

In gelatina a 37° C. (anaerob.). Intorbidamento uniforme, deposito fioccoso.

Brodo (semplice, glucos., anaerob.). Intorbidamonto con scarso deposito, solo nelle colture molto vecchie.

Latte. — Non sviluppa.

In *piastre* dopo ripetuti passaggi si hanno colonie appena visibili come goccioline di rugiada.

Azione patogena.

PRIMO ESPERIMENTO. — Cavia 1ª iniettata nel peritoneo: cavia 2ª nel sottocutaneo. Entrambe con 3 cmc. di brodocoltura di 48 ore. Dopo due giorni muore la cavia n. 2. Si riscontra alla sezione edema sanguinolento del sottocutaneo; niente nei tessuti e negli organi interni. L'esame microscopico mostra la presenza di un bacillo identico a quello iniettato.

La cavia n. 1 non ha alcuna manifestazione.

SECONDO ESPERIMENTO. — Cavia n. 3 iniettata nel peritoneo con 4 centimetri cubici di gelatina. Cavia n. 4 nel sottocutaneo con 2 cmc. della stessa cultura.

Cavia n. 3 non presenta alcuna reazione. Cavia n. 4 morta dopo 48 ore. Le istesse alterazioni della cavia n. 2, di più ingrossamento dei gangli linfatici inguinali. Iperemia delle capsule surrenali. Lieve ingrossamento della milza. Col liquido dell'essudato si coltiva in coltura pura il bacillo iniettato.

TERZO ESPERIMENTO. — Cavia n. 5. Si inietta nel peritoneo mezza brodo cultura, più un'ansa di bacillo prodigioso. Morte dopo 24 ore. Iperemia e infiltrazione ematica del sottocutaneo. Essudato torbido nel peritoneo. Depositi fibrinosi purulenti sul fegato e sull'intestino. Tumore di milza.

Esame microscopico positivo per l'essudato. Negativo per il sangue e per gli organi interni.

Cavia n. 6. Si inietta allo stesso modo (2 cmc., più un'ansa di B. prodigioso sterilizzata per 15′ a 80° C.) Morte dopo 24 ore. Infiltrazione notevole edematosa emorragica del sottocutaneo con lieve enfisema. Le altre alterazioni come i precedenti esperimenti.

QUARTO ESPERIMENTO. — Cavia n. 7. Si inietta con mezza brodocoltura di bacillo di 24 ore ed una mezza patina di stafilococco aureo. Muore dopo 14 ore. Le stesse alterazioni avute nei casi precedenti si hanno anche in questo esperimento, però notasi una maggiore e più estesa infiltrazione sierosa emorragica. I muscoli molto flaccidi e rammolliti. L'esame microscopico sia dell'essudato che della milza furono positivi per i bacilli e per i cocchi.

I conigli si mostrarono refrattari sia alle iniezioni sottocutanee che intraperitoneali. Le iniezioni di culture pure della vescica dei conigli, combinata alla legatura temporanea dell'asta produsse sempre una cistite purulenta. Gli animali morivano nel termine di 15 giorni circa, riscontrandosi, oltre che i segni della cistite anche una degenerazione dell'epi-

telio renale. L'esame dell'essudato vescicale dava in prevalenza il bacillo da noi iniettato.

QUINTO ESPERIMENTO. — Cavia n. 9. Iniettata con 3 cmc. di filtrato di colture di 3 giorni. Cavia n. 10 con 1 cmc. dello istesso filtrato. Cavia n. 11 con 5 cmc. di filtrati di 15 giorni. Muore solo la cavia n. 9 dopo 4 giorni, e mostra alla sezione una notevole iperemia ed infiltrazione del sottocutaneo in corrispondenza specialmente della iniezione.

Epicrisi.

Il decorso eccezionalmente grave e la fine rapida del malato, malgrado che la terapia chirurgica fosse in tempo opportuno intervenuta, ci fece subito ritenere che ci trovassimo in presenza di una infezione particolarmente grave. Chi ha avuto occasione di osservare e curare molti ammalati delle vie urinarie sa che spesso, anche nelle più estese infiltrazioni urinose, con gravi fenomeni generali, la cura chirurgica, riesce a salvare la vita dell'infermo, quando è praticata in tempo opportuno. Nel caso in esame le lesioni esterne erano all'inizio e pure l'infermo perì subitamente. Dobbiamo attribuire questa gravità alla virulenza del germe da noi isolato? E' cosa difficile ad asserire. Il germe anaerobico trovavasi infatti in compagnia di numerosi altri aerobi, e, data la ricchezza di varietà batteriche, che osservammo nell'essudato, possiamo supporre che forse non era il solo anaerobio presente. Notevole la sua virulenza per le cavie, sia da solo che in associazione, sebbene noi avessimo adoperato generazioni molto vecchie. La lesione prodotta consisteva in una grave infiltrazione emorragica per la quale l'animale soccombeva rapidamente.

***

CASO II (n. 29). *Notizie cliniche.* — N..... N..... di circa 70 anni è accolto in ospedale in gravissime condizioni. Da molto tempo aveva bisogno di esser siringato. Alcuni giorni fa si ebbe difficoltà nell'introduzione della siringa e sopravvenne tosto febbre alta e forti dolori nella regione perineale. Il medico curante non riuscì a mettere un catetere a permanenza. Però sopravvennero fatti generali gravi ed una estesa infiltrazione della regione perineale e scrotale per la quale non fu invocato il soccorso chirurgico. L'infermo è ora in condizioni disperate. Stato adinamico, polso impercettibile, obnubilazione della coscienza. Una vasta zona di infiltrazione edematosa va dallo scroto fino all'altezza dell'ombellico. La pelle ha un colorito ardesiaco e fredda e in alcuni punti si osservano bolle ripiene di liquido fetido. Assenza di gas nei tessuti. Stante la gravità del caso non crediamo intervenire chirurgicamente. L'infermo infatti muore dopo un paio d'ore dopo il suo ingresso in ospedale. Non fu permessa l'autopsia. Poco prima della morte fu praticata una piccola incisione allo scroto e fu raccolto colle solite cautele un po' di liquido per farne oggetto di studio.

Esame batteriologico.

Coll'esame microscopico si riscontrano leucociti più o meno disfatti che si colorano male, globuli rossi e microrganismi rappresentati da batteri piccoli e sottili e cocchi. Un preparato colorato col Gram faceva vedere che questi bacilli si scoloravano quasi completamente mentre dei cocchi alcuni restavano colorati, altri no.

Colture aerobiche. — Isolamento del solo stafilococco albo in cultura pura.

Culture anaerobiche. — Praticate coi soliti metodi. Abbiamo in tal modo isolato i seguenti germi:

1° Un cocco negativo al Gram formato di elementi piuttosto grossi e rotondi, raggruppato in mucchi irregolari, cresceva solo in anaerobiosi, non sviluppò dopo il terzo passaggio. Le colonie rotondeggianti non avevano niente di caratteristico.

2° Un bacillo di cui esponiamo i caratteri.

Caratteri morfologici. — Bastoncino sottile e snello alquanto ricurvo a guisa di un vibrione. Estremità affilate, lungo 2-5 μ., colorabile con tutti i colori di anilina. Negativo al Gram, tendenza alla disgregazione granulare. Caratteristico il raggruppamento. Mostrava elementi uniti ad angolo più o meno ottuso. Rassomiglianti alle antenne di una farfalla oppure ad un V. Talvolta apparivano disposti ad angolo retto. Questo raggruppamento era caratteristico e costante.

Caratteri culturali:

Per agitazione: in agar glucosato colonie piccole granulose, di colorito quasi biancastro, qualche volta tendente all'arancione. Questo colorito non si è conservato nei passaggi.

Infissione: agar glucosato. — Cresceva sotto forma di nastrino delicato molto ed appena visibile. Sviluppo discontinuo lungo la infissione. Si arrestava un po' al disotto della superficie.

Il germe non sviluppò in nessun altro terreno e non si lasciò coltivare che fino alla quinta generazione.

Epicrisi.

Caso studiato incompletamente, perchè non ci fu concesso di vedere l'ammalato che per poche ore, nè ci fu permesso praticare la autopsia.

Si riteneva fino a pochi anni fa che il flemmone urinoso fosse dovuto all'azione deleteria dell'urina nei tessuti. Gli autori moderni, però, specialmente quelli della scuola francese hanno già da tempo richiamato l'attenzione sulla presenza degli anaerobi in queste lesioni. A questi germi, devesi molto probabilmente la gangrena dei tessuti infiltrati. Questo argomento merita speciali ricerche.

Il bacillo da noi isolato in questo caso ebbe corta vitalità, così

pure il cocco. Non avendone noi studiato che pochi caratteri non tentiamo neppure identificarlo con le specie più note. Rileviamo solo che la sua forma ricorda quella dei vibrioni.

IV. — Suppurazioni peritoneali di origine intestinale.

A questo gruppo abbiamo più specialmente rivolto le nostre ricerche studiandone ben sette casi.

Tre di queste suppurazioni erano provocate dalla perforazione dell'appendice vermiforme.

Due da perforazione di ulcera tifosa.

Una da perforazione del sigma colico, per un processo la cui natura non abbiamo ancora potuto determinare.

Dei tre casi di appendicite (nn, 10, 17 e 28) due ebbero decorso letale, sebbene operati. Nel caso n. 28, l'operazione consistette nell'aprire secondariamente una raccolta marciosa, l'ammalata guarì. Nel solo caso n. 17 (operazione a caldo eseguita nel 2° padiglione del Policlinico), non riuscimmo ad isolare alcun germe anaerobico, quantunque coll'esame diretto dell'essudato, avessimo constatato una gran quantità di germi non corrispondenti a quelli che ottenemmo con le culture.

Nella seconda serie di casi (peritoniti causate dalla perforazione di ulcere tifose, nella quale comprendiamo anche il n. 16) solo un caso fu negativo: il n. 11. Fu questo un caso davvero fortunato, poichè l'intervento operatorio fu eseguito presumibilmente poche ore dopo l'avvenuta perforazione. Le lesioni della sierosa erano insignificanti, nell'addome non si riscontrò se non un liquido siero torbido in cui non riscontrammo che cocchi e qualche raro bacillo tipo coli.

Caso I (n. 10). *Notizie cliniche.* — N.... N.... di circa 25 anni, accolta nell'ospedale di San Giovanni il 7 settembre 1906. Tre giorni prima era stata colta improvvisamente da dolori nel quadrante inferiore destro dell'addome, che andarono man mano divenendo più forti. Ebbe ripetutamente vomito e singhiozzo e febbre. Presentava addome meteorico generalmente dolente alla pressione. Notevole difesa muscolare. Massima dolenzia sul punto di Mac-Burney.

Diagnosi clinica. — Appendicite: probabilmente peritonite diffusa. Il giorno stesso fu praticata l'operazione. Fuoriuscì un liquido purulento di odor fetido. L'appendice gangrenata verso la sua parte media mostrava nel suo interno un contenuto purulento ed un calcolo fecale. Era contornata da spesse aderenze.

Decorso. — L'ammalata morì dopo 5 giorni con sintomi di peritonite diffusa. Non fu permessa l'autopsia.

Ricerche batteriologiche.

Esame microscopico. — Nel pus raccolto durante l'operazione si riscontrano in prevalenza grossi bacilli e cocchi. I primi negativi al Gram, i secondi restano colorati.

Colture aerobiche. — Si isola il solo streptococco piogeno.

Colture anaerobiche. — Si isola un solo bacillo che qui appresso descriviamo.

Caratteri morfologici. — Il bacillo è formato di bastoncini lunghi da 3.20 a 6.40 μ e larghi circa 0.90 arrotondato agli estremi. Quasi sempre isolato forma catene piuttosto lunghe. Sporifica in tutti i terreni. La spora è ovale e piuttosto grossa. Si colora bene con tutti i colori. Negativo al Gram. Non ha capsula, è mobile, ha ciglia vibratili. Nelle culture vecchie spesso presenta falsi filamenti.

Caratteri colturali. — Per agitazione in agar glucosato, sviluppa solo a 37° c. Colonie piccole rotonde, granulose; enorme produzione di gas fetido.

Infissione in agar glucosato. — Molto caratteristico. Cresce lungo tutta la infissione cominciando a qualche millimetro al disotto del tampone, formando un grosso nastro di aspetto scaglioso, costituito da ammassi di colonie con contorni frastagliati, produzione di gas. Odor fecaloide.

In gelatina e in brodo glucosato (anaerobiosi 37 c.) — Sviluppo stentato, lieve intorbidamento, scarso deposito dopo parecchi giorni.

Latte. -- Formazione di coagulo molle dopo 5 giorni, non si ridiscioglie.

In brodi di organi e brodi con patata cresce rapidamente con abbondante produzione di schiuma.

Azione patogena.

Esperimento I. — Iniezione di cultura pura del bacillo nel sottocutaneo e nel peritoneo di cavie e conigli. Cavie iniettate n. 4. Cavie 1 e 2 iniettate con coltura in gelatina (3 cm³.) di quattro giorni nel sottocutaneo. Si osserva nel secondo giorno notevole infiltrazione. Gli animali restano abbattuti e muoiono in terza giornata. Alla sezione notasi un edema sanguinolento nel sottocutaneo molto diffuso.

Cavie nn. 3 e 4. Si iniettano con la stessa dose e allo stesso modo nel peritoneo. Viva reazione. Addome dolentissimo alla palpazione. Morte dopo 36-48 ore. Alla sezione: notevole infiltrazione emorragica del sottocutaneo. Essudato siero-purulento nel peritoneo che mostrasi diffusamente iperemico. All'esame microscopico dell'essudato riscontrasi il bacillo iniettato. L'esame del sangue è negativo pel bacillo stesso. Le colture dell'essudato dànno il bacillo allo stato puro.

I conigli mostransi più resistenti. Colla iniezione intraperitoneale muoiono dopo 4-5 giorni. Colla iniezione nel sottocutaneo si forma un'escara, seguita spesso da guarigione. I risultati dell'autopsia e dell'esame microscopico sono identici.

Esperimento II. — Si inietta il bacillo insieme a una certa quantità di stafilococco aureo. S' iniettano due cavie, ciascuna con una infissione del bacillo e due anse di stafilococco diluite in brodo; ad un animale di controllo si inietta solo lo stafilococco. Questo animale sopravvive mentre le altre cavie mostrano una viva reazione: morte dopo 16-24 ore circa. Si osserva una infiltrazione a carattere emorragico molto diffusa alla parete addominale. L'autopsia praticata varie ore dopo la morte dimostrava la maggior parte dei bacilli frammentati e degenerati. Solo pochi individui mantenevano la loro forma all'esame microscopico.

Esperimento III. — Due cavie furono iniettate con 5 cmc. ciascuna di filtrati di 3 e 15 giorni. Quella iniettata con filtrati di 15 giorni morì nella quarta giornata mostrando solo una notevole iperemia al punto dell'iniezione.

L'altra morì in settima giornata in uno stato di grave deperimento senza segni caratteristici all'esame.

Epicrisi.

Il caso ebbe decorso letale sebbene operato nei primi tre giorni dall'inizio della malattia. Al momento dell'operazione esisteva già una peritonite diffusa.

***

Caso II (n. 28). *Notizie cliniche.* — N. N. entra in Ospedale (San Giovanni) 24 novembre 1906. Tre giorni prima era stata colpita da forti dolori al quadrante inferiore dell'addome che ben presto si generalizzarono a tutto il ventre. Ebbe contemporaneamente vomito, l'alvo si chiuse ed il dolore andò esacerbandosi notevolmente. Il vomito cessò dopo 2 giorni, però continuò ad avere nausea continua. Ricoverata in Ospedale, essendosi dopo alcuni giorni riscontrata una raccolta purulenta in corrispondenza della fossa iliaca destra, si sottopone ad operazione chirurgica che fu eseguita 7 giorni dopo l'inizio della malattia. Si riscontrò una raccolta marciosa non molto grande ma ben limitata formata da pus molto fetido ed icoroso.

Esame batteriologico.

L'esame microscopico diretto del pus fece rilevare la presenza di cocchi e di un bacillo snello che si scolorava col Gram.

Colture aerobiche. — Isolammo solo lo stafilococco albo.

Colture anaerobiche. — Isolammo un solo bacillo.

Caratteri morfologici. — Bastoncini lunghi da 4.80 a 9.50 μ., larghi circa 0.75. In colture giovani quasi sempre isolato; solo di rado in catene di 2-3 elementi. In colture vecchie filamenti che possono arrivare alla lunghezza di 16 μ. Nei tessuti mostrasi esclusivamente la forma isolata (v. Tav. XVII, fig. 2ª). Produceva spora ovale allungata terminale, rarissimamente centrale, che non si notava mai nei filamenti. Notevole la forma di

essa poichè era spesso molto acuminata. La sporulazione si aveva anche nei tessuti quando la sezione si praticava poche ore dopo la morte (v. Tav. XVII, fig. 2ª). La spora non resisteva a 80° c. Il bastoncino mostrava movimenti torpidi di traslazione e scarsi movimenti di trepidazione. Grande vitalità, colorabile con tutti i colori di anilina. Negativo al Gram.

Caratteri colturali. — Per agitazione in agar zuccherato forma colonie granulose e rotonde grandi non più di una capocchia di spillo, spesso contornate da alone torbido. Ricca produzione di gas. Caratteristico odore fecaloide in tutti i terreni.

Infissioni in agar. — Avviene lungo tutta la infissione lo sviluppo sotto forma di nastro grosso di aspetto squamoso. La parte superiore è molto più sottile. Lo sviluppo comincia dopo due giorni. Il germe non cresce che a 37° c.

In gelatina e in brodo glucosato (anaerob.) lievissimo intorbidamento.

Latte. — Coagula dopo 48 ore, non peptonizza.

In poltiglie di fegato e in brodi con patata rigoglioso sviluppo con produzione di spuma.

Azione patogena.

Le iniezioni delle culture in brodo non dànno alcun risultato stante la scarsezza dello sviluppo. Preferiamo allora diluire le infissioni in agar che sono molto rigogliose in liquido sterile.

Esperimento I. — Due cavie *A* e *B* si iniettano nel sottocutaneo con una cultura di vari giorni. Morte in circa 24 ore. Mostrano alla sezione una infiltrazione emorragica con poche bolle di gas. All'esame microscopico numerosi bacilli negli organi interni e nel sangue.

Esperimento II. — Due cavie *C* e *D* ricevono ciascuna nel peritoneo mezza coltura in agar ed un cmc. di brodocoltura di B. prodigioso di 24 ore sterilizzata ad 80° C., per 15'. Morte dopo 24 ore circa. Notasi: oltre all'infiltrazione solita del sottocutaneo un abbondante essudato sieroso torbido nel peritoneo. Milza ingrossata. Bacilli nell'essudato.

Esperimento III. — Allo stesso modo e colle istesse dosi si iniettano due altre cavie *E* ed *F*, che muoiono dopo circa 48 ore, presentando lesioni identiche a quelle provocate dal solo bacillo, ma molto più estese. Col liquido dell'edema estratto durante la vita dell'animale si allestisce una coltura colla quale si ottiene il bacillo allo stato puro.

Esperimento IV. — Iniezione del bacillo insieme allo stafilococco aureo. Si pratica nel solito modo servendosi di due cavie, cui si inietta a ciascuna la metà di una infissione del bacillo ed un'ansa di stafilococco. Per controllo si inietta una cavia col solo stafilococco: (2 anse).

Solo le due prime muoiono in circa 36 ore. Alla sezione notasi: la pelle della parete addominale necrotica per un tratto abbastanza esteso asportata a brandelli, i muscoli appaiono come disfatti e rammolliti (lessati). Nelle parti circostanti una notevole infiltrazione siero-ematica che si estende a tutto il sottocutaneo dell'addome e del petto. Congestione polmonare e renale. L'esame microscopico mostrava grande quantità di bacilli sporigeni nell'essudato.

Esperimento V. — I prodotti delle culture di 15 e 5 giorni filtrati, ammazzavano gli animali (cavie) in circa 15 giorni con segni di grave marasma (dose 5 cmc.).

I conigli iniettati sia con germe solo, sia contemporaneamente col B. prodigioso o collo stafilococco non mostrarono alcuna reazione.

***

Caso III (n. 13). *Notizie cliniche.* — L'ammalata era ricoverata nell'Ospedale di San Giovenni per tifo addominale, si trovava nel terzo settenario, quando si presentarono i sintomi di perforazione intestinale. Trasportata al reparto chirurgico fu subito operata: nel peritoneo si riscontrò un essudato purulento insieme a materie fecali. Morì dopo 24 ore. Non fu permessa l'autopsia.

Ricerche batteriologiche.

L'esame microscopico del pus fece rilevare la presenza di grossi bacilli negativi al Gram e di cocchi positivi a questa colorazione.

Colture aerobiche. — Isolammo: 1° Streptococco piogeno. 2° Stafilococco albo ed aureo. 3° *Bacterium coli commune*

Colture anaerobiche. — Isolammo un solo bacillo.

Caratteri morfologici. — Bastoncino lungo da 4 a 6 μ., largo 0.80. Disposto spesso a catena di vari elementi, forma spesso pseudo-filamenti. Piglia bene tutti i colori di anilina, qualche volta assume la colorazione fragmentaria. Negativo al Gram, mobile; ha ciglia vibratile, non ha capsula, produce spore piuttosto rotonde situate al centro del bastoncino o agli estremi di esso.

Caratteri culturali. — Per agitazione in agar glucosato: colonie puntiformi che non hanno niente di caratteristico. Enorme produzione di gas. Intenso odore fecaloide. A 37° c. lo sviluppo comincia dopo 38 ore.

Infissione in agar: forma un nastrino continuo leggermente scaglioso, lungo tutta la infissione fermandosi a qualche millimetro dalla superficie. A 22° c. sviluppo più lento.

Infissione in gelatina glucosata — Sviluppo lento dopo due giorni. Lungo l'infissione appaiono le colonie piuttosto staccate. Non dà liquefazione.

Gelatina glucosata a 37° (anaerob.). — Lieve opacamento con deposito nel fondo.

Brodo (anaerob.). — Di solito non dà sviluppo; qualche volta dopo parecchi giorni si osservano rare forme bacillari all'esame microscopico.

Latte. — Coagula dopo 48 ore; non peptonizza.

Poltiglie di fegato e brodo con patata. — Cresce abbondantemente con produzione di gaz.

Azione patogena.

Esperimento I. — Iniezione di culture pure nel peritoneo e nel sottocutaneo di cavie e conigli. Una cavia *A* si inietta nel peritoneo con cultura pura del bacillo isolato. Morta dopo 16 ore. Presenta un'intensa iperemia della sierosa peritoneale, essudato torbido, depositi fibrinosi, liquido

siero ematico nelle pleure. All'esame microscopico dell'essudato riscontransi in mezzo alle cellule di pus numerosi bacilli che si trovano anche nel sangue raccolto dal cuore.

La cavia *B* iniettata colla stessa dose di cultura pura nel sottocutaneo mostra un'infiltrazione gassosa che va man mano scomparendo.

Due conigli si iniettano ognuno con mezza coltura di gelatina l'uno nel sottocutaneo l'altro nel peritoneo. Il primo iniettato nel sottocutaneo mostra una notevole infiltrazione senza gas che, sebbene si riassorba gradatamente, produce la morte dopo 6 giorni. Nel sottocutaneo notevole infiltrazione emorragica. Il 2° coniglio iniettato nel peritoneo, muore dopo 4 giorni, mostrando un essudato sieroso purulento. L' esame microscopico e le culture praticate dimostrarono la presenza del bacillo da noi iniettato.

Altre due cavie (*C* e *D*) iniettate nel sottocutaneo con mezza coltura in gelatina del bacillo muoiono in 5 giorni mostrando le stesse lesioni riscontrate nel coniglio.

Esperimento II. — Iniettiamo il bacillo insieme allo stafilococco aureo. La dose del bacillo è di circa mezza infissione in agar stemperata in brodo in cui aggiungiamo due anse di una patina di stafilococco di 24 ore Una cavia di controllo si inietta con solo due anse di stafilococco; altre due vengono iniettate nel modo suddetto nel sottocutaneo. Decorso grave; lesione molto più estesa, la morte si ha in 48 ore circa. Notasi un edema sanguinolento diffuso a tutta la parete addominale e toracica, con fuoruscita di grande quantità di liquido, quando si pratica l'incisione della pelle. I muscoli molto rammolliti. Lieve tumor di milza, intensa iperemia renale. Coll'esame microscopico dell'essudato e della polpa degli organi interni riscontrasi in grande quantità cocchi e bacilli. Controllo negativo.

Esperimento III. — Iniettiamo i filtrati di culture di 3 giorni a due cavie (dose 3 cmc. per ciascuna). Muoiono dopo 8-9 giorni con segni di grave deperimento.

***

Caso IV (n. 16). *Notizia clinica.* — Soggetto di anni 20, affetto da prolasso rettale per il quale subì varie operazioni chirugiche. Durante la degenza nell'Ospedale di Sant'Antonio ebbe per alcuni giorni chiusura dell'alveo e dolori addominali. Dopo qualche giorno vomito e singhiozzo. Trasferito al nostro reparto riscontrammo una peritonite diffusa che credemmo prodotta da qualche perforazione intestinale. Praticammo subito la laparotomia, riscontrando una peritonite diffusa con grande quantità di essudato fetido e gassoso (pneumo-peritonite). Questa peritonite era causata da una perforazione esistente al livello del sigma colico. L'ammalato soccombette dopo circa 24 ore.

Autopsia. — Riscontrammo l'esistenza di varie ulcerazioni in corrispondenza del sigma colico la cui natura non abbiamo potuto ancora determinare. La perforazione di una di queste aveva dato luogo alla infezione peritoneale. Niente altro di interessante agli esami degli altri organi ad eccezione di una stenosi di lieve grado esistente alcuni centimetri al disopra dello sfintere anale.

Esame batteriologico.

Esame microscopico. — Nel pus notammo in mezzo a leucociti più o meno disfatti cocchi variamente aggruppati e bacilli positivi al Gram.

Colture aerobiche. — Riuscimmo facilmente ad isolare lo stafilococco aureo e il *bacterium coli.*

Colture anaerobiche. — Col metodo di Vignal isolammo un bacillo strettamente anaerobico.

Caratteri morfologici. — Bastoncino sottile, lungo da 1.60 a 3.30 μ. Disposto spesso in corte catene. Forma filamenti che non superano mai i 15 μ (v. Tav. XVII, fig.4ª). Lievi movimenti di trepidazione e progressione. Non riusciamo a dimostrar ciglia vibratili, nè capsula. Non osservammo mai sporificazione. Colorabile con tutti i colori di anilina e col Gram. Tendenza alla disgregazione.

Caratteri colturali. — Per agitazione in agar glucosato piccole colonie grigie, lenticolari. Sviluppano solo in profondità.

Infissione in agar. — Lo sviluppo comincia solo dopo il terzo giorno a 37° c. Nei primi passaggi e per molte generazioni lo sviluppo avviene solo nella parte più profonda della infissione. Questo carattere lo conserva per molto tempo. Lo sviluppo, che è molto stentato sempre e meschino, ha forma di nastro. Le colonie sono però spesso staccate e disposte a rosario. Più rigoglioso nell'agar al formiato e alla glicerina. Non dà gas nè odori caratteristici.

Infissione in gelatina. — Sviluppo dopo molti giorni appena appariscente.

Gelatina, brodo glucosato (anaerob.). — Intorbidamento appena percettibile dopo parecchi giorni. Gelatina a 22° non fluidifica.

Latte. — Sviluppa senza coagulare, reazione acida.

Poltiglie di organi e brodi con patate. — Cresce molto presto senza produrre gas.

Azione patogena.

ESPERIMENTO I. — Cavia 1, cavia 2 iniettate con una brodocoltura ciascuna, la prima nel peritoneo la seconda nel sottocutaneo. N. 1 morta dopo 5 giorni. Essudato siero-purulento nel peritoneo. Capsule surrenali e reni iperemici. Coll'esame microscopico dell'essudato e del sangue si riscontrano bacilli corrispondenti a quelli iniettati per forma e caratteri, come ci assicuriamo per mezzo di culture anaerobiche che dànno risultato positivo.

Cavia n. 2 mostra una notevole infiltrazione, indi necrosi della cute e formazione di escara. Morte in settima giornata. Alla sezione notasi al di sotto della zona necrotica un'infiltrazione purulenta. Niente di notevole all'esame degli organi interni. Coll'esame microscopico dell'essudato notammo piccoli bacilli disposti a coppia simili a quelli iniettati. In questo caso pungemmo asetticamente dopo due giorni la infiltrazione del sottocutaneo ricavandone un liquido sanguinolento torbido da cui ottenemmo in cultura pura il bacillo.

ESPERIMENTO II. — Due cavie, 3 e 4 vengono iniettate la prima nel sottocutaneo, l'altra nel peritoneo con brodocoltura. La cavia n. 3 mostrò

la stessa reazione e lo stesso decorso della n. 2, però finì col guarire. La n. 4 mostrò reazione solo nei primi giorni.

Esperimento III. — — Coniglio n. 1. Iniettato con una gelatina di 48 ore nel sottocutaneo. Notevole infiltrazione che si riassorbì nello spazio di una settimana lasciando solo un nodulo indicativo.

Coniglio n. 2, coniglio 3, iniettati nel peritoneo il primo, col solo bacillo anaerobio, l'altro col bacillo stesso insieme al bacillo prodigioso: non mostrarono alcuna reazione.

Esperimento IV. — Cavia n. 5 iniettata nel sottocutaneo con 3 cmc. di coltura cui si aggiunge un'ansa di patina di prodigioso ad 80° per 15'. Intensa reazione, vasta infiltrazione nella parete addominale che diminuisce nei giorni successivi. L'animale però muore dopo 2 giorni. In corrispondenza della parete addominale, al di sotto della cute esisteva una piccola chiazza di infiltrazione purulenta della grandezza di circa un centimetro quadrato. I muscoli infiltrati e rammolliti. Iperemia del rene e delle capsule surrenali, tumore di milza. Esame microscopico dell'essudato e del sangue positivo.

Esperimento V. — Cavie 5, 6, 7. N. 5 iniettata con 3 cmc. di brodocoltura di stafilococco nel sottocutaneo. N. 6 e 7 la stessa dose di stafilococco più circa 3 cmc. di gelatina contenente il bacillo anaerobio. Queste due ultime mostrano subito una vasta infiltrazione della parete addominale che riducesi nei giorni successivi, ma produce in tutti i modi la morte in quarta giornata. La n. 5 mostra solo una piccola infiltrazione che va mano mano risolvendosi. L'autopsia delle cavie 6 e 7 fa rilevare essudato siero-purulento nel sottocutaneo con infiltrazione della parete muscolare. Iperemia delle capsule surrenali e dei reni. Ipertrofia della milza, congestione polmonare. Esame microscopico positivo per i cocchi e i bacilli che spesso mostransi endo-cellulari.

Esperimento VI. — Con il filtrato delle culture di 3 giorni si iniettano le cavie 8 e 9. La 8 con 5 cmc. muore dopo 5 giorni presentando notevole deperimento; la 9 con 3 cmc. sopravvive.

Osservazioni.

Su sette casi di peritonite da perforazione abbiamo avuto tre casi in cui le ricerche degli anaerobi sono state negative. Se l'affermazione di Friedrich, che non v'è peritonite da perforazione senza anaerobi avesse valore assoluto, dovremmo senz' altro addebitare ad insufficienza tecnica i risultati negativi di cui abbiamo parlato. Ma siccome egli afferma ciò solo in base alla osservazione microscopica (che non è certo bastevole a dire se una forma sia o pur no anaerobica), così è lecito supporre che in qualche caso almeno gli anaerobi possano realmente mancare.

Possiamo pertanto ritenere che nelle peritoniti da perforazione si trovino sempre associate insieme più specie batteriche in cui quelle anaerobiche rappresentano certamente una parte importante. Nei

casi da noi studiati crediamo che non tutte le specie esistenti siano state da noi isolate. Ciò è specialmente evidente nel caso VI in cui notavasi una grande ricchezza di forme all'esame microscopico.

V. — Flemmone e gangrena gassosa.

Abbiamo studiato tre casi riferibili a questa categoria ed abbiamo in tutti e tre isolato un germe anaerobico. Due di questi casi sono stati osservazioni personali.

Caso I (n. 24). *Notizie cliniche.* — N. N., accolto nell'ospedale di Sant'Antonio il 24 ottobre 1906, è albuminurico e glicosurico da vari anni. Ha molti denti cariati. Presenta un'infiltrazione flemmonosa in corrispondenza della regione sottomascellare sinistra e della guancia corrispondente. Febbre alta, stato setticoemico. Non si riscontra gas nei tessuti nè chiazze gangrenose. Si pratica una grande incisione colla quale si apre una raccolta purulenta e fetida posta al disotto del periostio del mascellare. I tessuti circostanti rammolliti ed infiltrati.

Nel giorno seguente notasi diminuita l'infiltrazione in corrispondenza della regione sottomascellare sinistra, ma essa si è diffusa verso destra. Stato generale sempre grave. L'edema della regione sottomascellare destra si estende anche alla guancia corrispondente dove la pelle va assumendo un colorito nerastro a chiazze piccole confluenti. Colla palpazione si riscontra un enfisema sottocutaneo. Si pratica in questo focolaio una nuova incisione fino a raggiungere la mandibola; da essa fuoriesce sangue schiumoso. Il sottocutaneo è infiltrato, i muscoli rossi e spappolati. L'ammalato muore dopo poche ore. L'autopsia non è permessa.

Ricerche batteriologiche.

Esame microscopico. — Riscontrasi cocchi e bacilli di varia forma. Notevole un bacillo sottile resistente al Gram. I cocchi tutti positivi al Gram.

Culture aerobiche. — Si isola lo stafilococco albo.

Colture anaerobiche. — Si isola facilmente un bacillo anaerobio stretto.

Caratteri morfologici. — Bastoncino sottile lungo 1.60-2.50 μ. Nelle culture giovani quasi sempre isolato. Non forma filamenti, nei tessuti si dispone a catena di 2-3 elementi. Estremi arrotondati. Spesso appare sotto forma di pera o di clava. Non sporifica. Immobile Si colora bene con tutti i colori di anilina e col Gram. Nelle colture specialmente in terreni solidi degenera facilmente mentre conserva la sua forma nelle culture impure (v. Tav. XVII, fig. 5ª). La forma bacillare si conserva meglio nei terreni liquidi e nelle poltiglie di organi.

Caratteri culturali. — Per agitazione in agar glucosato lo sviluppo comincia nella terza giornata, solo alla temperatura di 37°. Colonie puntiformi granulose, bene sviluppate in profondità dove sono alquanto più grosse.

Infissione in agar gluc. — Sviluppa solo nella parte profonda nell'infissione. Qualche volta le colonie sono ammassate, il più delle volte però sono disposte a rosario, staccate l'una dall'altra. Non produce gas.

In gelatina, brodo (37° C. anaerob.). — Non si ha sviluppo che dopo numerosissimi passaggi: esso è sempre scarsissimo.

Latte. — Cresce senza coagulare. Reazione acida.

Brodi con poltiglia e con patata. — Cresce bene senza mostrare forme degenerative molto presto.

Azione patogena.

Esperimento I. — Si iniettano culture pure nel peritoneo e nel sottocutaneo di cavie e conigli. Le cavie mostrano una infiltrazione dolorosa che guarisce in pochi giorni. I conigli non mostrano alcuna reazione.

Esperimento II. — Una cultura del bacillo insieme ad un'ansa di patina di prodigioso si inietta nel sottocutaneo e nel peritoneo di due cavie. La cavia iniettata nel peritoneo muore nella ses'a giornata. Non si riscontra essudato alcuno nella cavità peritoneale, ma solo un tumor di milza; coi preparati di quest'organo si dimostra la presenza del caratteristico bacillo prodigioso e di un bacillo che corrisponde a quello da noi isolato e che appare alquanto più lungo che non sia nei terreni culturali.

La cavia iniettata nel sottocutaneo mostra una notevole infiltrazione coperta dalla pelle molto arrossata. Nei giorni successivi si manifesta una zona di necrosi. Morte in settima giornata. Niente di caratteristico alla sezione. La milza alquanto ingrossata, contiene bacilli nel suo parenchima. Con una puntura asettica praticata in vita eseguimmo l'isolamento del germe che mostrava gli stessi caratteri di quello inoculato.

Esperimento III. — Si inietta il bacillo insieme al *B.* prodigioso, sterilizzato a 80° C. per 15'. Si iniettano così 3 cavie che muoiono tutte nel termine di 5-6 giorni. Manifestazioni identiche a quelle dell'esperimento precedente: notevole infiltrazione emorragica. Necrosi della cute. Formazione di escara al di sotto della quale si riscontra una infiltrazione purulenta. Notevole iperemia diffusa a tutto il sottocutaneo della parete addominale. Lieve sviluppo di gaz. Milza ingrossata. Congestione renale e polmonare. Si riscontrano bacilli all'esame microscopico nell'essudato e nella polpa splenica.

Iniettati allo stesso modo alcuni conigli si hanno gli stessi risultati. Gli animali diventano cachettici e muoiono di marasma in 25-30 giorni circa. All'autopsia oltre la lesione locale si riscontra essudato sieroso nel peritoneo e tumor di milza.

Esperimento IV. — Il bacillo si inietta insieme allo stafilococco aureo. Si usano due cavie che si iniettano con una brodo-coltura e circa due anse di stafilococco. Le due prime cavie muoiono dopo circa 36 h. Esse mostrano una vasta infiltrazione diffusa a tutta la parete addominale e toracica. La sezione eseguita dieci ore dopo la morte presentava quanto segue:

La pelle era macerata e si distaccava a brandelli in corrispondenza della parete addominale; fuoriusciva una enorme quantità di liquido siero-emorragico che infiltrava il sottocutaneo. I muscoli apparivano rammol-

liti e di color di carne lessata. Assenza di liquido nel peritoneo, milza ingrandita, congestione polmonare.

All'esame microscopico reperto positivo nell'essudato e negli organi, sia per i cocchi che per il bacillo.

Esperimento V. — Iniettammo 4 cavie. Due con i filtrati di culture di 15 giorni (dose 5 cmc.). Le cavie morirono con sintomi di cachessia dopo circa 17 giorni. Due cavie furono poi iniettate con filtrati di culture di 3 giorni. Esse morirono più rapidamente in 3-4 giorni, presentando nel sottocutaneo una diffusa iperemia.

Epicrisi.

L'infezione certamente di origine dentaria ebbe un decorso rapido e grave. Dal punto di vista batteriologico notiamo quanto segue. Certamente non abbiamo isolato tutte le forme batteriche contenute nell'essudato. Il bacillo da noi isolato era strettamente anaerobio ed aveva alcune caratteristiche, fra cui quella di crescere soltanto nella parte più profonda della infissione e quella di dare rapidamente forme degenerative. Infatti, nelle culture anche di solo 4 giorni, apparivano le forme più bizzarre, a clava, a biscotto, pera, ecc. Sovente il germe si fragmentava in modo da rassomigliare a raggruppamento di cocchi, perdendo completamente la forma bacillare. Solo le generazioni molto giovani o quelle coltivate insieme ad altri germi, conservano la forma caratteristica che si osservava sempre nei tessuti. Stante il fatto della moltiplicità dei germi nel focolaio morboso, stante il fatto che gli esperimenti hanno avuto esito positivo solo per le associazioni microbiche, non crediamo dover ritenere che questo germe sia stato l'agente patogeno *esclusivo* della necrosi e della suppurazione gassosa da noi studiata.

***

Caso II (n. 27). *Notizie cliniche.* — Un sottufficiale russo di guarnigione a Candia fu ferito dalla esplosione di un fucile Gras. Il proiettile dopo aver traversato il calcio del fucile che portava al fianco mentre trovavasi in corsa, attraversò da parte a parte i muscoli della gamba destra poco al di sotto dell'articolazione del ginocchio. Il proiettile si deformò notevolmente e produsse estese lacerazioni. Nella ferita si trovò polvere, pezzi di legno e di abito. Dopo un giorno nell'arto colpito si manifestò una zona di gangrena che si estese a tutta la gamba, indi sintomi di setticemia molto gravi. In seguito si osservarono strie linfo-angioitiche sulla coscia corrispondente. I fatti generali scomparvero rapidamente e restò solo la gangrena gassosa, estesa a tutta la gamba. L'edema gassoso si spingeva anche verso la coscia. La ferita secerneva un icore fetido. Dopo 16 giorni fu praticata l'amputazione della coscia al terzo superiore. Dopo 40 giorni l'infermo era completamento guarito. Il pus fu inviato al nostro Istituto di igiene.

Ricerche batteriologiche.

Esame microscopico. — Si osservavano forme bacillari e cocchi variamente aggruppati, tutti i bacilli si scoloravano col metodo di Gram.

Colture aerobiche. — Isolammo lo stafilococco aureo ed un bacillo aerobico stretto.

Colture anaerobiche. — Isolammo un bacillo strettamente anaerobio che qui appresso studiamo.

Caratteri morfologici. — Bastoncino lungo da 3 a 6 μ, largo circa 1 μ. Quasi sempre isolato, forma qualche volta catene di 2 o 3 elementi. Sporifica in tutti i terreni. La spora è larga poco più del bacillo, ha forma ovale, è terminale, raramente centrale. Non ha capsula, è mobile, ha ciglia vibratili, prende tutti i colori di anilina. Negativo al Gram. Cresce solo in anaerobiosi.

Caratteri culturali.

Per agitazione in agar glucosato. — Colonie rotonde piccole, non caratteristiche. Enorme produzione di gas, che non emana alcun odore speciale.

Infissione, in agar glucosato. — Forma un nastro molto delicato, sviluppato specialmente in profondità. Sviluppa solo a 37° c., ed incomincia dopo 24 ore.

Gelatina-brodo (anaerob.): cresce lentamente. Il liquido mostra un lieve intorbidamento dopo parecchi giorni.

Latte. — Coagulazione dopo 12 giorni. Non peptonizza.

Brodo di organi e brodo con patate. — Cresce bene con sviluppo di gas.

Le spore resistono a 80° c. per 10′.

Azione patogena.

Esperimento 1°. — Cavie e conigli non reagirono alla iniezione del bacillo in cultura pura. L'azione patogena fu studiata dopo che il germe era stato mantenuto in vita per oltre sei mesi con successivi passaggi.

Esperimento 2°. — Iniezione del bacillo insieme al B. prodigioso. Quest'ultimo germe si esponeva alla temperatura di 60° C. per 15′. Si iniettava una infissione del nostro germe insieme a mezza patina circa di prodigioso. Tre cavie furono ciascuna iniettata con tal dose, presentando tutte le seguenti manifestazioni. Rapida ed estesa infiltrazione del sottocutaneo in corrispondenza della regione addominale. Necrosi della cute. Morte in 3 o 4 giorni. In uno di questi animali si praticò la puntura asettica durante la vita: col liquido estratto di color siero-ematico molto torbido, si fecero colture colle quali si isolò il germe iniettato. Le cavie morte presentavano alla sezione una infiltrazione edematosa molto diffusa nel sottocutaneo, con scarso enfisema. Iperemia dei reni e delle capsule surrenali. L'esame microscopico del sangue per la ricerca del bacillo fu negativo. Lo riscontrammo invece in grande abbondanza nel tessuto della milza. Il bacillo nei tessuti appariva alquanto più grosso e più lungo. Due cavie iniettate colla stessa quantità di germi allo stesso modo nel peritoneo non mostrarono alcuna reazione.

Esperimento 3°. — Iniezione del bacillo insieme allo stafilococco aureo. Si usano 3 cavie. Una di esse a scopo di controllo si inietta con 3 anse di stafilococco. Le altre due si iniettano rispettivamente con una coltura in agar del bacillo diluita in brodo cui si aggiunge la stessa dose della stessa coltura di stafilococco. Le due cavie iniettate col bacillo e con lo stafilococco muoiono in 2ª giornata. L'altra resta in vita senza mostrare alcuna reazione. L'autopsia delle cavie morte praticate circa 8 ore dopo la morte dimostra quanto segue. Pelle necrotica e rammollita, si distacca a brandelli. Notevole infiltrazione edematosa, fuoriesce grande quantità di essudato siero-ematico. Muscoli rammolliti. Bolle di gas fra le maglie dei tessuti. Negli organi interni niente di caratteristico. Coll'esame microscopico si riscontrano cocchi e bacilli sporulanti.

Esperimento 4°. — Con i filtrati delle colture di 3 e 15 giorni non si ha alcuna manifestazione nelle cavie.

I conigli si mostrarono refrattari al germe anche in simbiosi con il bacillo prodigioso.

Epicrisi.

E' questo uno dei più tipici casi di flemmone gassoso. La terapia chirurgica applicata in tempo opportuno salvò la vita del paziente. Il germe da noi isolato trovavasi in compagnia dello stafilococco e di un altro germe non gassogeno, noi perciò siamo propensi a ritenerlo come l'agente patogeno di questa lesione anche per la notevole sua virulenza in simbiosi con altri germi.

***

Caso III (n. 26). *Notizie cliniche.* — N..... N....., accolto all'Ospedale di Sant'Antonio il 2 novembre 1906. Ventiquattro ore prima cadde sotto un carretto le cui ruote gli passarono sulle gambe. Alla gamba sinistra riscontravasi una frattura esposta comminuta in corrispondenza del 3° medio. Alla gamba destra una contusione escoriata in corrispondenza del 3° inferiore. A questo punto ed in corrispondenza dell'articolazione tibio-tarsica esisteva, al momento in cui fu accolto in ospedale, un edema esteso anche al dorso del piede. Trattata convenientemente la frattura si praticò in corrispondenza del piede e della parte escoriata un opportuno trattamento antisettico. L'infermo fu sottoposto ad una narcosi cloroformica di circa mezz'ora. Il 1° giorno lo stato generale apparve buono sebbene la temperatura arrivasse a 38° C. Ebbe però subito vomito ostinato ed irrequietezza che attribuimmo a postumi cloroformici. Dopo 3 giorni circa notammo improvvisamente una temperatura di oltre 39° C. ed uno stato molto agitato che cominciò a preoccuparci. L'infermo infatti tentava alzarsi, strapparsi le fasciature ed accusava dolore specialmente in corrispondenza dell'arto destro. Quivi notammo subito una colorazione bluastra che si estendeva a tutto il dorso del piede, all'articolazione tibio tarsica e al quarto inferiore della gamba. La cute appariva più edematosa del giorno precedente ed era eccessivamente fredda. La sensibilità sia tattile che dolorifica era conservata. I sintomi generali

diventarono di mano in mano più gravi: febbre alta, polso piccolo e frequente, sudore profuso, vomito incessante ed ostinato, occhi infossati, lingua patinosa, denti fuliginosi. Pensammo subito alla esistenza di una grave infezione generale. L'esame dell'urina non ci fece rilevare se non tracce di albumina. Indugiammo alcune ore prima di praticare l'amputazione, tenuto conto dello stato dell'altra gamba. Ma dopo trascorse poche ore, avendo notato che la cute si sollevava già, formando delle vescicole, decidemmo senz'altro d'intervenire.

L'infermo già però trovavasi in condizioni così gravi che morì mentre si trasportava nella sala d'operazione.

Autopsia. — L'arto destro appariva edematoso di colorito grigio-ardesiaco dal dorso del piede fino al tutto il 3° inferiore della gamba. Più in alto il colorito era rosso cupo che andava man mano degradando fin quasi a metà della coscia dove la pelle aveva un colorito pressochè normale. Alla palpazione non si riscontrava enfisema. Praticato un taglio profondo si notava una imbibizione emorragica della cute del sottocutaneo dei muscoli. Essa era così abbondante che dalla superficie di taglio colava in abbondanza il liquido rossastro. Nelle parti che avevano assunto il colorito ardesiaco l'infiltrazione era nettamente emorragica. I muscoli avevano perso la loro struttura ed apparivano come una poltiglia rossastra. Nella parte superiore della gamba l'infiltrazione era limitata soltanto alla cute. Qua e là bolle contenenti liquido rossastro. Cuore sano, polmoni sani, degenerazione grassa del fegato, rigonfiamento torbido dell'epitelio renale. Milza ingrossata ed alquanto rammollita.

Ricerche batteriologiche.

Esame microscopico. — Col materiale raccolto all'autopsia dall'essudato e con lo strisciamento degli organi interni si fanno dei preparati. Nella sierosità dell'edema si notano in mezzo ad elementi dei tessuti più o meno disfatti e mal colorati cocchi, bacilli tozzi e corti in catena di 3 o 4 individui. Nel sangue del cuore nessuna forma batterica. Negli altri organi (rene, milza, fegato) riscontriamo un bacillo piuttosto tozzo disposto in catena oppure formante corti filamenti. Questo bacillo resisteva al Gram.

Colture aerobiche. — Isolammo lo streptococco piogeno ed un bacillo tipo coli.

Colture anaerobiche. — Dopo molti passaggi isolammo un bacillo anaerobio.

Caratteri morfologici. — Bastoncino corto e tozzo (1.50 μ. a 2 di lunghezza. 0.80 di larghezza). Estremi arrotondati. Solo di rado isolato, per lo più in coppie o in catene di vari elementi. Grande tendenza a dare forme degenerative. Nei tessuti conserva meglio la forma ed appare alquanto più grosso. Spesso assume forma clavata o simula catene di streptococco. Non sporifica, non ha capsula. Immobile. Si colora bene con i colori di anilina. Positivo al Gram.

Caratteri colturali. — Sviluppa bene in agar semplice, glicerinato, glucosato, al formiato, alla temperatura di 37° C. ed a 22°, più lentamente.

Per agitazione. — Le colonie appaiono rotonde sviluppate specialmente in profondità.

Infissione in agar. — Mostra un nastrino continuo uniformemente sviluppato. Spesso le colonie sono staccate l'una dall'altra.

Infissione in gelatina. — Sviluppa dopo 48 ore senza liquefare.

Gelatina a 37° C., *brodo glucosato* (anaerobiosi). Sviluppo lento con deposito fioccoso. In gelatina l'aspetto dei bacilli è differente; formano catene di elementi regolarmente rotondeggianti e corti.

Latte. — Coagula in quarta giornata; non peptonizza.

Brodi di organi e con patate. — Sviluppa bene.

Azione patogena.

Esperimento I. — Cavie *A*, *B*, *C*, iniettate nel sottocutaneo mostrano estesa infiltrazione flogistica (brodo-cultura con piccola dose: mezza goccia di acido lattico). Necrosi della pelle. Morte in 6-8 giorni. Riscontrasi alla sezione un'escara con una perdita di sostanza scodellare con estesa infiltrazione all'intorno. L'esame microscopico mostra piccoli bacilli disposti a catene di 2 e più elementi. Col liquido dell'edema estratti in vita, mediante puntura, si allestisce una coltura colla quale si isola il bacillo iniettato.

Esperimento II. — Cavie *D*, *E*, *F* iniettate con brodocoltura nel peritoneo. Solo la cavia *D* guarisce. *E*, *F* muoiono in 5 giorni. Nel peritoneo diffusa iperemia, assenza di essudato, presenza di bacilli all'esame microscopico.

Esperimento III. — Iniezione del bacillo insieme al prodigioso sterilizzato a 80° C. Cavie *G*, *H* iniettate con una brodocultura ciascuna, più tre anse di prodigioso. Morte in 2 giorni. Reperto necroscopico identico al precedente, però la infiltrazione emorragica del sottocutaneo è molto più estesa. Rammollimento dei muscoli della parete addominale. Coll'esame microscopico si constata la presenza degli organi.

Esperimento IV. — Iniezione del bacillo insieme allo stafilococco. Si adoperano 3 cavie. Una di esse per controllo si inietta nel sottocutaneo con 3 anse di cultura di stafilococco. Le altre rispettivamente nel sottocutaneo e nel peritoneo con una coltura di bacillo in brodo cui si aggiunge la stessa dose di stafilococco. Gli animali muoiono dopo 4-3 giorni. Riscontrasi nella 1ª essudato sieroso limpido nel peritoneo con depositi fibrinosi su le anse intestinali; nella 2ª vasta infiltrazione emorragica del sottocutaneo. Cavia controllo, risultato negativo.

Esperimento V. — Conigli iniettati nel peritoneo non mostrano alcuna reazione. Nel sottocutaneo intensa reazione. Pelle arrossata ed edematosa. Colla puntura fuoriesce liquido siero-ematico in cui si riscontrano bacilli disposti in catena. Nei giorni successivi formazione di un'escara o di un piccolo ascesso. Il bacillo riesce ad ammazzare il coniglio solo se iniettato insieme ad una piccola dose di stafilococco aureo. Lo stafilococco iniettato, da sè solo non produce la morte, cosa da noi stabilita con esperimento di controllo. Nel sotttocutaneo in questi casi riscontrammo sempre un essudato siero-emorragico. La morte avvenne sempre in un massimo di giorni tre. I filtrati delle culture di varia epoca si mostrarono innocui.

Epicrisi

Abbiamo creduto annettere questo caso nel nostro lavoro, sebbene non si trattasse di una *suppurazione*, per il fatto che la lesione ed il quadro morboso erano dovuti certamente alla presenza di germi anaerobi o quanto meno ad associazione batterica in cui questi germi rappresentavano una parte importante. Del resto forse solo la rapidità della morte impedì la formazione di un essudato purulento.

L'aspetto dell'arto in cui si sviluppò la descritta lesione, ricordava a prima vista quello della gangrena d'origine embolica. Però l'edema diffuso e la conservata sensibilità ci fece emettere la diagnosi clinica di *edema maligno*.

La rarità con la quale oggi giorno si osserva una simile lesione ci ha spinto ad indagare le manifestazioni cliniche che vanno sotto tal nome. Senza qui ripetere la discussione sulla differenza morfologica tra il bacillo dell'edema maligno e dei germi affini, riproduciamo la sintomatologia di tale lesione come è descritta da Jensen in Kolle e Wassermann: « rapida comparsa di un notevole rigonfiamento edematoso, talvolta anche enfisematoso, accompagnata da alta febbre. Nei casi lievi che finiscono con guarigione, la infiltrazione si limita abbastanza rapidamente, mentre che in altri casi si espande per una gran parte del corpo e finisce con la morte. Alla sezione notasi una infiltrazione sierosa od emorragica molto notevole del sottocutaneo e del connettivo intramuscolare. Contemporaneamente e in più lieve grado, infiltrazione dei muscoli della parte colpita, i quali, insieme alle glandole regionarie sono più o meno anche infiltrati di sangue. Talvolta sia nei muscoli che nel sottocutaneo si riscontra grande quantità di gas fetido. In alcuni casi si trova inoltre anche un essudato di carattere purulento, come pure osservasi un esteso disfacimento gangrenoso del connettivo e della cute ».

Questa descrizione che concorda con le alterazioni riscontrate nel nostro caso ci autorizza a ritenere esatta la nostra *diagnosi clinica*. Però il germe da noi isolato non si avvicina per alcun carattere al vibrione settico, il che non fa meraviglia se si pensa che talora una stessa infezione può essere causata da agenti morbosi diversi.

D'altronde il descritto quadro morboso può avvicinarsi alla cosidetta « gangrène foudroyante » *senza gas*, secondo la descrizione di Hitschmann e Lindenthal.

Altri casi studiati.

Abbiamo inoltre studiato altri casi di suppurazione, nei quali le ricerche per gli anaerobi sono state negative. Li citiamo brevemente.

Suppurazioni a carico dell'orecchio e cavità annesse. N. 3 casi (2, 23, 25).

Suppurazioni pleuriche e polmonari. N. 3 casi (1, 6, 9).

Suppurazioni del fegato e vie biliari. Casi 2 (n. 7, 12).

Suppurazione a carico dello psoas iliaco. Caso n. 15.

Artrite purulenta. Caso n. 8.

Caso di piemia a localizzazioni multiple. Caso n. 21.

Considerazioni batteriologiche generali.

Prima di accingerci alla identificazione dei germi isolati è utile dare uno sguardo alla qui annessa tabella n. 1 in cui si trovano sinotticamente i caratteri principali dei nostri germi. Per maggiore semplicità schematizziamo la forma con queste tre parole: *tozzo,* per una forma grande presso a poco quanto il B. del carbonchio. *Snello,* per forme più esili e più lunghe. *Piccolo,* per forme sottili e corte. Nella colonna gelatina *fl.*, vuol dire fluidifica, *c* in quella del latte coagula; *p,* peptonizza. La produzione del gas si intende in terreno glucosato.

TABELLA I.

Bacilli	Forma	Gram.	Movimenti	Spore	Gelatina	Latte	Gas	Odore	Forma delle colonie	Azione patogena
Bac. A. (Caso 10)...	Tozzo	—	+	Ovali-terminali	+ 37°	C. +	+	Fec.	Rotonde granulose	Cavie, conigli: infiltrazione edematosa sanguinolenta, necrosi.
Bac. A. (» 27)...	Id.	—	+	Ovali-terminali o centrali	+ 37°	C. +	+	—	Rotonde	Cavie, conigli: (solo in associazione come precedente).
Bac. A. (» 28)...	Snello	—	+ torp.	Ovali-terminali allungate	+ 37°	C. +	+	Fec.	Id.	Cavie: infiltrazione emorragica, gas.
Bac. B. (» 13)...	Tozzo	—	+	Rotonde-centr. o terminali	Fl. —	C. +	+	Fec.	Id.	Cavie, conigli: infiltrazione emorragica, gas, peritonite.
Bac. C. (» 26)...	Piccolo	Sì	—	—	Fl. —	C. +	—	—	Id.	Cavie: Edema emorragico necrosi.
Bac. D. (» 18)...	Snello	Sì	—	Molto rare	Fl. —	C. +	—	—	Lenticolari	Conigli: Ascesso, necrosi.
Bac. E. (» 16)...	Id.	Sì	+ torp.	—	Fl. —	C. —	—	—	Id.	Cavie, conigli: edema sanguinolento, necrosi.
Bac. F. (» 24)...	Id.	Sì	—	—	+ 37°	C. —	—	—	Rotonde granulose	Cavie: infiltrazione emorragica, necrosi, suppurazione.
Bac. G. (» 19)...	Id.	—	+	—	Fl. —	—	—	—	Rotonde	Cavie: edema sanguinolento. Coniglio, idem.
Id. (» 29)...	Id.	—	?	—	?	?	—	—	Id.	??

N.B. Nella finca « Latte » il segno C. + significa coagulazione positiva, C — coagulazione negativa e il segno - mancanza delle proprietà indicate nella rispettiva testata.

***

Per potere paragonare questi germi con le principali specie anaerobiche già studiate facciamo seguire una tabella nella quale sono riassunti i caratteri indicati dai vari autori per ciascuna di esse.

Parecchi germi ritenuti prima differenti sono stati poi identificati o quasi tra loro, perciò al di sotto del nome prescelto si trovano i sinonimi. Se avessimo voluto riprodurre tutti i germi anaerobii, più o meno incompletamente descritti avremmo fatta opera vana e penosa. Ci siamo limitati però alle specie meglio studiate e a quelle riscontrate più d'una volta. Riportiamo anche i germi di Sanfelice e di Rodella pel fatto che essi hanno compiuto uno studio sistematico. Tuttavia si vede che i germi completamente studiati anche fra i citati son ben pochi.

Ciò premesso si comprende come non sia agevole comparare utilmente un germe isolato, in modo da trarne criterî di identificazione. A ciò si aggiunge che alcuni caratteri non sono da accettare, così come vengono dagli autori accettati. Un esempio: Il *B. emphisematosus* è descritto da alcuni come sporigeno, da altri come asporigeno: a chi dar retta? Achalme ha messo però in chiaro che in assenza di idrati di carbonio questo germe produce spore, ma non le produce nella condizione contraria. Noi accettiamo questa condizione perchè dedotta da fatti sperimentali e spiega le contraddizioni.

Se questo accade con uno dei germi meglio studiati e per una proprietà delle più importanti, ci sarà lecito mover dubbio a più forte ragione alle indicazioni concernenti altri germi imperfettamente studiati. Tuttavia, noi accettiamo le cose senza discuterle, nè possiamo fare altrimenti, in attesa che future ricerche vengano a mettere in chiaro molte cose controverse. (Segue tabella 2ª).

TABELLA II.

Nome	Forma e grandezza	Spora	Movimento	Gram	Gelatina	Latte	Gas
B. emphysematosus (Fränkel, Kruse) *B. aërogenes caps.* (Welch, Nuttall).. *Granulobac. immob.* (Schattenfroh e Grassberger.	Come *B. anthracis*, estremi arrotondati, coppie, talora capsula	Rarissime (Alchalme)	—	—	Fl. —	C. —	+
B. necrophorus (Flügge)............. *Streptothrix Cunic.* (Schmorl) .... *B. diphtheriae Vitulorum* (Löffler)...	Circa come *B. anthracis*, estremi arrotondati, lunghissimi filamenti	—	—	—	?	+ Odor fetido	+ in siero agar
B. paraputrificus (Bienstock)........ *B. enteritidis sporogenes* (Klein)..... *B. perfringens* (Veillon, Zuber) ..... *B. di Achalme*......................	Lungo, più snello del *B. anthracis*	Ovali, terminali	Oscillatorio	+	Fl. +		+
B. putrificus coli (Bienstock)	Come il precedente	Idem.	Idem	Idem	Idem		—
B. fusiformis (Veillon, Zuber).......	Estremi affilamenti	—		—	Fl. —	—	Gas fetido
B. serpens (Veillon, Zuber)	Coppie, filamenti	—	—	+	Fl. +	+	
B. radiformis (Rist., Guillemont)....	?	—	—	—	Fl. +		
B. funduliformis (Hallé)	Piccolo, curvo	—		?	—		

N.B. - Nella finca « Latte » il segno C. + significa coagulazione positiva, C — coagulazione negativa e il segno — mancanza delle proprietà indicate nella rispettiva testata. Dove manca l'indicazione significa che il relativo carattere non è ben descritto. ? significa che è dubbio.

Segue TABELLA II.

Nome	Forma e grandezza	Spora	Movimento	Gram.	Gelatina	Latte	Gas
B. lactoides (Rist., Guillemont)	Ovale, allungata	?	—	—	—	?	+
B. ramosus (Veillon, Zuber).........	Piccolo: corti filamenti	—	+	+	—		+ Gas fet.
B. fragilis (Veillon, Zuber)	Piccolo, coppie	—	?	+	Fl. —		—
B. di Ghon Mucha (1)...............	Come B. influenza, forme coccacee	—	—	—	+ 37°	+ lentamente	—
B. mortiferus (Harris)	Coppie, filamenti	—	—	—	Fl. —	C + P +	—
B. furcosus (Veillon, Zuber)	Piccolo: a volte biforcato Y	—	—	—	—		+
B. nebulosus (Hallé)	Piccolo	—		—			
B. Sanfelice I		—	—	—	Fl. —		+
B. Sanfelice II....................		Term.	+		Fl. —		+
B. polhyformis (Liborius)							
B. Sanfelice III...................		+	+	+	Fl. —		—
B. solidus (Luderitz)							
B. Sanfelice IV. .... *Clostridium solidum*.		Centr.	+		Fl. —	C. +	—
B. Sanfelice V. .... *Clostridium foetidum* (Liborius)		Centrali o terminali	+		Fl. +	C. +	+
B. Sanfelice VI		Terminali			Fl. +	C. +	+
B. liquefaciens parv. (Lüderitz)							

(1) Isolato in un caso di meningite.

Segue TABELLA II.

Nome	Forma e grandezza	Spora	Movimento	Gram	Gelatina	Latte	Gas
B. liquefaciens magnus (Lüderitz) ...		Terminali			Fl. +	+	+
B. Sanfelice VII, Pseudo b. edema. mal. (Liborius), in parte *B. radiatus,* Lüderitz		Idem	+		Fl. +		+
B. Sanfelice VIII .... *B. spinosus* (Lüderitz)		Idem	+		+		+
B. Sanfelice IX. Pseudo tetanico		Idem	+		Fl. +		+
B. Rodella — Feci sane .... *I*..		Mediane o terminali	—	+	Fl. ±	Color rosa	
B. Rodella — Feci sane .... *II*..		Mediane ovali	—	+	Fl. +	C. — P. —	
B. Rodella — Feci sane .... *III*..		Ovali terminali	—	+	Fl. +	Idem.	
B. Rodella — Feci di malati *IV*..			—	+	Fl. +	P. +	
B. Rodella — Feci di malati *V*..			—	+	Fl. +	C. + P. +	
B. Rodella — Feci di malati *VI*..			—	+	Fl. +	?	
B. Rodella — Feci di malati *VII*..			—	+	—	C. — P. —	
B. Rodella — Feci di malati *VIII*..			—	+	—	C. P. —	
B. aërogenes necrosans (Schupfer) ...	Diritto, tozzo a copple	Ovali, terminali	+	+	+	+	Fetido in agar glicerinato
B. pseudotetani (Tavel)	Snello, 37° c. optimum	Terminali, ovali	+	—	—		Gas fetido

***

Paragonando fra di loro il carattere dei 10 germi isolati, li possiamo raggruppare nel modo seguente: i bacilli isolati nei casi 10, 27 e 28 hanno gli stessi caratteri e perciò ne facciamo un unico tipo che denominiamo *Bac. A*.

Tutti gli altri germi sono differenti fra di loro e li contrassegnamo con le successive lettere dell'alfabeto.

Sicchè i germi isolati appartengono a 7 specie differenti (specie nel senso poco rigoroso che gli si attribuisce in batteriòlogia). Vediamo ora con quale dei germi precedentemente studiati dagli autori si possono identificare o per lo meno avvicinare i nostri bacilli.

Il *Bac. A* somiglia in tutto al *B. paraputrificus* Bienstock, se non che non si sviluppa in gelatina a 24°. Questo carattere invece ci permette di avvicinarlo al *B. pseudo-tetani* (Tavel). Tanto più che questo era già stato osservato nelle sezioni di appendici malate dalla signorina v. Mayer (Clinica di Roux); nell'essudato di peritonite appendicolari da Tavel e Lanz, molto tempo prima che l'uno di essi lo isolasse.

Il *Bac. B* si avvicinerebbe al IV di Sanfelice (*Clostridium solidum*) se ne discosta però perchè produce gas anche in terreni semplici.

Il *Bac. C* per forma e grandezza ricorda quello isolato da Ghon e Sachs in un caso di peritonite, se ne discosta perchè è positivo al Gram e non dà gas. Per le stesse ragioni non può essere avvicinato al *B. fragilis* de Veillon-Zuber, perciò non possiamo identificarlo con nessuna forma bene studiata.

Il *Bac. D* ha tutti i caratteri del B. enfisematoso, ma non produce gas in nessun terreno.

Il *Bac. E* si distingue per la mancanza di proprietà fermentative (non coagula, nè peptonizza il latte, non produce gas, non fluidifica la gelatina). Non è identificabile con alcuna specie ben descritta.

Il *Bac. F* si avvicina al precedente ma se ne discosta: 1° perchè dà sempre forme degenerative (fragmentazione), nè dà filamenti; 2° perchè non ha movimento; 3° non si sviluppa a 22°; 4° perchè mentre l'*E* è patogeno per la cavia, l'*F* per sè solo non è patogeno ma lo diventa in associazione.

Il *Bac. G* ha molte proprietà dell'*E*. Se ne distingue perchè: 1° ha mobilità più netta, non resiste al Gram; 2° non sviluppa in latte.

Il germe isolato nel caso n. 29 non possiamo identificarlo perchè mancano troppi caratteri.

In conclusione, abbiamo isolato tre specie sporigene, delle quali due mobili (*A*, *B*): una immobile (*D*), di questo il Bac. *A* è identificabile col *Bac. pseudi-tetani* (Tavel); il *B* può avvicinarsi al *Clostridium solidum* (Sanfelice). Inoltre quattro specie asporigene, delle quali due mobili *E*, *G*. e due immobili *C*, *F*.

Queste non si possono identificare con alcuna specie ben descritta. Lo stesso dicasi del Bac. *D*.

***

Quanto alla produzione di gas fetidi nelle colture l'ho potuta riscontrare solo nei bacilli *A* (1) *B*, quantunque il materiale morboso tramandasse in tutti i casi odore nauseante. Abbiamo già detto che ciò può attribuirsi alla presenza di altri germi non isolati. Una considerazione generale che riguarda l'azione patogena è questa, che gli effetti della inoculazione di colture pure, nelle cavie e nei conigli, non sono stati mai imponenti, talora anzi negativi malgrado il materiale provenisse da casi molto gravi. Ciò è addebitabile probabilmente al fatto che per potere ottenere una coltura pura inoculabile abbiamo quasi sempre dovuto ripetere molti passaggi con i quali la virulenza veniva certamente diminuita. Non ostante ciò, quando associavamo al germe isolato una piccola quantità di acido lattico, si otteneva quasi sempre la morte dell'animale. E' importante il fatto che tutti i germi in associazione batterica dimostrarono una forte azione patogena.

Le lesioni, salvo l'intensità, sono state presso che identiche in tutti i casi, cioè: infiltrazione edematosa emorragica, talora produzione di gas. Spesso necrosi della pelle, talora peritonite essudativa siero-purulenta.

Negli animali in cui l'infezione aveva un decorso prolungato si aveva un essudato purulento. L'iniezione dei filtrati delle brodocolture non ebbero quasi mai un'azione tossica acuta, ma solo un'azione marantica che produceva la morte dell'animale.

***

Dalla esposizione della letteratura e dalle nostre ricerche risulta che la presenza di germi anaerobi è pressochè costante non solo nei flemmoni e suppurazioni gassose in generale, ma anche nelle peri-

(1) Meno il caso 27 da noi col 10 e 28 classificato nelle specie *A*. Questo germe non ha dato gas fetido, inoltre la sua infissione è alquanto differente. Ma questi caratteri non ci hanno autorizzato a farne una specie a sè.

toniti da perforazione ed in tutte le infezioni che hanno rapporto più o meno diretto col tubo intestinale. Lo stesso dicasi per le suppurazioni dentarie e per le infiammazioni delle cavità e regioni annesse (tonsille, adenoflemmoni del collo, orecchio, mastoide, ecc.). La gangrena polmonare, gli empiemi putridi e molte infezioni di origine genitale od urinaria sono quasi sempre provocate da questi germi.

Ora due quistioni ci si presentano:

1° Quale importanza etiologica spetta agli anaerobi isolati nei prodotti di una data infezione?

2° Hanno essi un'azione specifica determinata, produce cioè ognuno di essi sempre la stessa lesione? Viceversa una stessa lesione è causata specificamente solo da uno di essi?

Per riconoscere ad un germe qualsiasi la dignità di agente infettivo, si richiede in generale che esso sia costantemente presente negli organismi in preda a quella data infezione, che si isoli *in coltura pura* e che esso riproduca *sperimentalmente negli animali* una infezione uguale o simile a quella che si stabilisce spontaneamente nell'uomo o nell'animale.

Tuttavia, non si può disconoscere che questa triplice esigenza non è sempre soddisfatta, e nondimeno in molti casi non si esita a stabilire un nesso tra il germe osservato e l'infezione.

Vi sono anzitutto microrganismi appartenenti ai protozoi, i quali (salvo casi e condizioni speciali) non si coltivano. Malgrado ciò nessuno dubita della loro importanza etiologica: esempio classico i parassiti della malaria umana e degli animali. Ma vi sono anche dei germi sicuramente di natura batterica che o non si coltivano, o si coltivano con molta difficoltà, in ogni caso hanno una vitalità fuggevolissima nei terreni di coltura e perciò non si prestano all'esperimento. Così è noto, restando nel campo dei patogeni, che il bacillo della lepra non si coltiva o, secondo alcuni, si coltiva con grande difficoltà solo in terreni speciali. E quale vitalità ha il B. dell'influenza nell'agar-sangue? Quale il gonococco di Neisser, anche nei terreni ricchi di proteine non denaturate? Siffatta condizione si è verificata anche per alcuni anaerobi che sono stati osservati al microscopio, e pure non si sono avuti in coltura pura. E' questione certamente di tecnica, talora la presenza di quantità anche piccole di una data sostanza permette rigoglioso sviluppo a germi che altrimenti non nascerebbero.

Passiamo all'altra condizione, quella della riproduzione sperimentale della infezione. Ciò non sempre si può ottenere coll'inoculazione delle colture pure, ma spesso coll'inoculazione dei succhi stessi del-

l'organismo che contengano solo il germe che si studia: è questo sempre il caso dei protozoi.

Fermandoci a ciò che riguarda i batteri diremo ancora che ve ne sono dei patogeni che, negli animali di laboratorio, non producono lesioni di sorta (gonococco). Ve ne sono di quelli patogeni solo per la scimmia (B. dell'influenza). Ancora di quelli che pur essendo patogeni per i comuni animali di laboratorio, non riproducono in essi le lesioni ed i sintomi che si osservano nell'uomo (B. del tifo). Certamente esistono bacteri la cui inoculazione causa le stesse alterazioni (B. della tubercolosi): e presso a poco gli stessi sintomi (V. del colera) che si notano nell'uomo. Bisogna tener inoltre conto del fatto, che è possibile che alcuni germi patogeni per parecchi animali non lo siano per altri (B. del carbonchio, patogeno per la cavia, non patogeno per il cane, pollo). Non si può così negare l'importanza etiologica ad un dato germe isolato solo perchè non ha azione patogena per i comuni animali di laboratorio, potendosi sempre pensare che possano esistere altre specie animali che siano ricettive.

Per ragioni analoghe, dal solo fatto che un dato germe è patogeno per una o più specie di animali, non si può dedurne senz'altro la sua importanza etiologica nell'uomo. Per parecchie malattie infettive, tuttavia, si è avuta la prova sperimentale nell'uomo, per infezione volontaria o accidentale. Chi non ricorda i casi di colera sperimentale nelle persone di Pettenkofer ed Emmerich, di Oergel? Della blenorragia prodotta sperimentalmente negli studenti dal Bum? Ma questo non è certo un metodo!

Conchiudendo, ciò che veramente si può e si deve costantemente richiedere è la *dimostrazione costante del germe* che si presume causa di una infezione, nell'organismo e nei prodotti morbosi. Quando si possa aggiungere l'una o l'altra o entrambe le condizioni suddette, tanto meglio, ma la mancanza di esse non deve ostacolare le conclusioni che la ultima condizione può concedere.

***

Nei nostri casi parecchi anaerobi, *microscopicamente osservati* sono stati isolati *in cultura pura*, e, *inoculati* soli o in simbiosi hanno dato *resultato positivo* in cavie e conigli.

Allo stato odierno delle nostre cognizioni ci è dunque lecito ammettere che *i germi isolati dovevano avere un nesso causale con le lesioni riscontrate*. Certo, non possiamo dire *se ciascuno di essi per sè solo* era capace di produrre quelle alterazioni, tanto più che si trovavano sempre in associazione.

Avendo dunque ammessa la loro importanza etiologica, sia da soli che in simbiosi, spettano ad essi anche proprietà specifiche?

Da molti si è creduto e forse ancora si crede alla specificità dei germi della gangrena e suppurazione gassosa. Così il germe di Welch-Fränkel, si ritiene quasi esclusivamente esserne causa. Così il B. dell'edema maligno si ritiene causa di questa speciale lesione. Ma chi dia uno sguardo alla letteratura non resterà in tale idea, poichè di alcuni germi isolati in vari casi di suppurazioni gassose si è intanto certi che sono differenti dal suddetto bacillo. Le mie ricerche confermano questa veduta. Si tratta, crediamo, solo di maggior frequenza di un germe rispetto all'altro, è certo però che una *medesima lesione* può essere causata da batteri sistematicamente vicini, ma pur sempre differenti. Così nelle mie ricerche è stato più frequentemente trovato il *B. pseudo-tetani* di Tavel. Di tale opinione è anche il De Gaetano, il quale, avendo isolato, in tale infezione, due germi aerobi, estende il concetto da me sopra accennato, riconoscendo la molteplicità dei microrganismi che possono dare origine a tale processo morboso.

In tutte le lesioni in cui si trovano gli anaerobi si trovano pressochè costanti due caratteri: *quello della necrosi e della infiltrazione gassosa, e quello dell'odor fetido*. E' certo che questo secondo carattere devesi con grandissima probabilità attribuire alla presenza di anaerobii. Sebbene la putrefazione sia stata spesso attribuita alla presenza di protei e di *B. coli*, pure gli esperimenti non sono concludenti in proposito, poichè spesso manca uno studio completo degli anaerobi. Anche la presenza del gas nei tessuti è quasi sempre dovuta all'azione di questi germi; ma in verità si sono anche riscontrati germi aerobi con proprietà gassogene. Tralasciando di parlare degli ultimi citati, per le ragioni già dette, accenniamo ai germi di Uffenheimer, Legros, De Gaetano, il quale ultimo anzi ha riprodotta sperimentalmente la lesione gassosa cogli aerobi isolati.

Oltre ai caratteri suesposti possiamo ritenere che molti anaerobi abbiano un potere tossico. Colle ricerche sperimentali nostre, abbiano inoltre potuto confermare quanto già era stato rilevato da Roger ed altri che l'associazione di più germi anche per sè soli non patogeni possono produrre gravi lesioni nei tessuti e gravi infezioni.

Le alterazioni prodotte nei tessuti dagli anaerobi sono alquanto differenti da quelle dei piogeni comuni, poichè quelli di solito non producono un essudato purulento, se non quando l'infezione assume un decorso sub-acuto, ma per lo più un essudato emorragico ed una estesa necrosi dei tessuti. Questi fatti non si osservano sempre nettamente, avendo spesso a fare con infezioni miste.

Dalle ricerche esposte in questo lavoro, risultano le seguenti

Conclusioni:

1. I germi anaerobi si trovano quasi costantemente nelle suppurazioni gassose del sottocutaneo, nelle peritoniti da perforazione e nelle infiltrazioni urinose;

2. La presenza degli anaerobi nelle suppurazioni impartisce a queste uno speciale carattere fetido;

3. Non è ancora possibile, per la maggior parte dei germi isolati, stabilirne la *specificità*, ad eccezione di poche forme, molte volte riscontrate e perciò meglio studiate;

4. Sebbene i germi isolati si dimostrino spesso poco virulenti, pure, iniettati insieme con altri batteri in modo da riprodurre in certo qual modo sperimentalmente le condizioni di associazione batterica, che tanto di frequente si riscontra nell'uomo, acquistano una notevolissima virulenza.

ABBREVIAZIONI USATE.

1. A.I.P. = (Annales de l'Institut de Pasteur).
2. B.I.P. = (Bulletin » » »).
3. A. Bl. C. = (Archiv f. Klin. Chirurgie).
4. A. med. e. = (Archives de médecine expérimentale, ecc.).
5. Ann. o. g. = (Annales des maladies des organes génito-urinaires).
6. A. f. Hg. = (Archiv. f. Hygiene).
7. A. Kl. Med. = (Archiv. f. Klin. Medecine).
8. C. f. Ch. = (Centralblatt f. Chir.).
9. B. z. P. An. = (Ziegler's Beiträge ann.).
10. B. Kl. Ch. = (Beitrage zur Klin. Chirurgie).
11. C. fr. Ur. = (Congrès français d'Urologie).
12. D. m. W. = (Deutsche med. Woch.).
13. C. f. all. P. = (Cent. f. Allgemeine Pathologie, ecc.).
14. Cl. m. = (Clinica medica).
15. C. f. G. = (Centralbl. f. Gynaek).
16. C. f. B. = (Centralbl. f. Bakteriologie).
17. Mü. med. W. = (Münchener med. Woch.).
18. S. m. Hôp. P. = (Société médic. Hôpit. de Paris).
19. Soc. B. = (Société Biologie).
20. Vir. A. = (Virchow's Archiv).
21. W. Kl. W. = (Wiener Klin. Wochenschrift).
22. Z. f. Ch. = (Zeitschrift f. Chirurgie).
23. Zt. H. = (Zeitschrift f. Hygiene).

LETTERATURA.

ACHALME P. *Recherches sur quelques anaérobies et leur différentiation*. A.I.P., 1902, p. 641.

ID. *Recherches bactériologiques sur le rhumatisme articulaire aigu*, A.I.P., 25 nov. 1897.

ALBARRAN et COTTET. *Note sur le rôle des microbes anaerobies dans les infections urinaires*. C. fr. Ur., 1898.

ALBRECHT. *Ueber Infection mit gasbildenden Bakterien*. Ar. Kl. C., vol. 67.

ARKÖVI. *Experimentelle Untersuchungen über Gangrän an der Zahnpulpa u. Wundgagrän*. C. f. Ch., 1898.

ARKÖVI. *Ueber B. gangrenae pulpae*. C. f. B., vol. 19, 1901.

ARLOING. Arch. de med. exper., vol. V.

BABES. *Sur la pathogénie des gangrènes pulmonaires*. Semaine médicale, 1900, n. 5.

BAIER. *Ueber Buttersäuregährung*. C. f. B., vol. I, 1895.

BARTH e RIST. *Pleurésie putride à microbes anaerobies d'origine biliaire*. S. m. Hôp. P., vol. 14, p. 1417.

BAUP et STANCULÉANU. *La bacteriologie des empièmes des sinus de la face*. Arch. roumaines des sciences médicales, 1900.

BERNHARDT. *Ein Fall von Pneumathämie u. Schaumorgane*. D. m. W., 1900, n 5.

BIENSTOCK. *Anaerobies et Symbiose*. A.I.P., vol. 16.

ID. *Ueber die Bacterien der foeces*. Zt. H., vol. VIII, 1884.

ID. *Untersuchungen ü. die Aetiologie d. Eiweissfäulniss*. A. f. Hg., vol. 36-39.

ID. *Recherches sur la putréfation*. A.I.P., vol. 13.

BOTKIN. *Eine einfache Methode zur Isolirung von anaeroben Bacterien*. (Zt. f. H. vol. IX, 1890).

v. BRUM M. *Ueber Peritonitis. Zusammenfassendes Referat ü. Peritoneum Litteratur des Jahres 1885-1900*. C. f. all. P., 1905.

BONI J. *Sopra un caso di setticopioemia dell'uomo di origine probabilmente tonsillare*. Cl. m. i., 1902, n. 9.

BRUNNER C. *Weitere klinischen Beobacktungen uber Aetiologie u. Klin. Therapie der Magen perforation u. Magenperitonitiden*. B. Klin. Chir., vol. 40, 1903.

BUCHNER. *Eine neue Methode zur Kultur anaerober Mikrorganismen*. C. f. B., vol. IV, 1888.

BURRI. *Zur Isolirung der Anaeroben*. C. f. B., vol. 8°, 1902.

CASSAET. *Un cas de symbiose pleurale*. 4me Congrès franç. de méd. Montpellier, 1896.

CHIARI. *Zur Bakteriologie des septischen Emphysem*. Prager mediz. Wochenschr., 1903, n. 1.

COOK, *Bacteriological investigations on pulp gangrene*. The Dental Review, 1899.

COTTET J. *Note sur un microcoque strictement anaérobie, trouvé dans les suppurations de l'appareil urinaire*. (Soc. B.). Soc. B., p. 421, 1900.

ID. *Recherches sur les suppurations peri-uretrales*. Inaug. Diss. Paris, 1899.

COTTET et DUVAL. Annales org. génito-urinaires, 1900.

COURMONT. *Rôle des associations microbiennes dans les pleurites putrides gasseuses.* 4me Congrès franç. de méd. Montpellier, 1898.

COURMONT et CADE. *Sur une septico-pyoémie de l'Homme simulant la peste et causé par un strepto-bacille anaérobie.* Ar. med. e., vol. II, p. 393.

DANSAUER. *Beitrag zur Kenntniss der Gasgangrän.* (Mü. m. W.), 1903, n. 3.

DE GAETANO. *Due casi di gangrena gassosa determinata da due differenti bacilli aerobi.* Tommasi, anno 1906, p. 695.

DU BOUCHET. *Recherches bactériologigues sur quelques cases d'infections utérines.* Th. Paris, 1897.

DUJON. *Etude sur la glande vulvo-vaginale et ses abcès.* Th. Paris, 1897.

ELLERMANN. *Ueber die Kultur der fusiformen Bacillen.* Idem, vol. 37. p. 729.

ERNST. *Ueber einen gasbildenden anaeroben in menschlichen Körper und seine Beziehung zur Schaumorgane.* Vir. A., vol. 133, pag. 308.

FLEXNER. *Pneumotorax from gas producing Bacteria.* Montreal med. Journal, 1899.

FRÄNKEL A. *Ueber putride pleuritis.* Charité Annalen, 1877. Berliner Kl. W. 1879.

ID. *Ueber einen Fall von Gastritis acutae emphysematosae wahrscheinlich mykotischen Ursprungs.* Vir. A., 1888.

FRÄNKEL E. *Ueber Gasphlegmone.* Hamburg, 1893.

ID. *Ueber den Erreger des Gasphlegmonen.* Mü. med. Woch., 1890.

ID. *Ueber Aetiologie der Gasphlegmonen.* C. f. B., vol. 13.

ID. *Ueber Gasphlegmon.* Zt. H., v. 40, 1902.

FUCHS. *Ein anaerober Eiterungserreger.* Inaug. Diss. Greifswald, 1890.

FRIEDMANN J. C. *On the anaerobic bacteria of the intestines.* Transactions of the Chicago path. Society, vol. 5, p. 172.

FRIEDRICH. *Zur bacteriellen Aetiologie und zur Behandlung der diffusen Peritonitis.* Arch. Kl. C., vol. 68, p. 524.

GHON u. MUCHA. *Zur Aetiologie der Peritonitis,* vol. 39-40. Zeuh. f. Bact.

GHON u. SACHS. *Zur Aetiologie des Gasbrandes.* C. f. B., vol. 36.

GHON, MUCHA u. MÜLLER. *Zur Aetiologie der Acuten Meningitis.* C. f. B., vol. 41.

GHON, MUCHA u. MÜLLER. *Zur Aetiologie der perinefrit'schen Abscesses.* C. f. B., vol. 42.

GOADKY. *Microorganisme in dental caries.* Transactions of Dental Society, 1899.

GOEBEL. *Ueber den Bacillus der Schaumorgane.* Jahrbucher der Hamburger Staatskrankenhaus, vol. IV.

GOURAND. *Infection puerpérale et gangrène pulmonaire par microbes anaérobies.* Soc. B., vol. 55. In. Cent. f. B., vol. 35, p. 727.

ID. *Gangrène pulmonaire puerperale par microbes strictement anaérobies.* Presse Médicale, 1903, p. 748.

GUILLEMONT. *Recherches sur la gangrène pulmonaire.* Thèse Paris, 1898.

GUILLEMONT, HALLÉ, RIST. *Recherches bactériologiques et expérimentales sur les pleurésies putrides.* Ar. med. e., 1904.

GERSTNER. *Beiträge zur Kentniss obligat anaerober Bacterienarten.* Arbeiten aus dem Bacteriologischen Institut d. technischen Hochschule zu Karlsruhe, vol. I, 1894.

GILBERT et LIPPMANN. *Bactériologie des cholécystites.* (Soc. B.), 1902, n. 30.

ID. *Du microbisme normale des voies biliaires extra-hépatiques.* (Soc B.), 1902.

ID. *Le microbisme biliaire normale.* Idem, 1903.

ID. *Le microbisme pancréatique normale.* Idem, 1904.

GRASSBERGER u. SCHATTENFROH. *Ueber Buttersäurebacillen und ihre Beziehung zu den Gasphlegmonen.* Mü. Mediz. Woch., 1900, n. 30, 31.

GRUNERT. *Mittelohr, Warzenforsatz u. intracranielle Komplicationen der Otitis.* Ergebnisse d. allgm. Pat. u. pat. Anat. von Lubarsch u. Ostergat, vol. VIII, 1902.

HALLÉ I. *Recherches sur la bactériologie du canal génital de la femme.* Thèse Paris, Steinheil, 1898.

ID. et BACALOGLU. *Sur la présence de microbes strictement anaérobies dans un cyste suppuré du foie.* A. med. e, 1900.

HALLÉ et GUILLEMONT. *Un cas de pleurésie putride monomicrobienne.* Bull. Soc. Pédiat., 1902.

HAMMERL. *Ein Beitrag zur Züchtung der Anaeroben.* C. f. B., 1901 1902, vol. 30 e 31.

HAMILTON. *Pneumothorax, its etiology, symptoms and signs.* Montreal med. Journal, 1898.

HARRAS P. *Zur Frage der aerober Zuchtung sogenannter obligat anaerober Bacterien.* Mü. med. W., 1906, n. 46.

HARRIS N. *A preliminary report upon a hitherto undescribed bacillus.* Journal of the Boston Soc. of. Med. Scien., vol. 5, p. 376.

HESSE W. u. R. *Ueber Züchtung der Bacillen des malignen Oedems.* (D. m. W.), 1885.

HOWARD. *Acute fibrino-purulente cerebro-spinal meningitis.* Bull. of. John Hopkin Hosp., vol. 10, 1899.

HOWARD. *A contribution to the knowledge of the B. aërogenes capsulatus.* John Hopkin's Hospital reports, vol. 9°.

HARTMANN et MIGNOT. *Note sur la suppuration gangreneuse des fibromes indépendants de la cavité utérine.* Ann. de Gynécologie, 1896.

HARTMANN et ROGET. *Contribution à l'étude bactériologique de cystites.* Presse médicale, 1902.

v. HIBLER E. *Zur Kenntniss der durch anaerobe Spaltpilze erzeugten Infections-Krankeiten.* C. f. B., vol. 25, 1899.

HINTSCHMANN u. LINDENTHAL. *Ueber « Gangrène foudroyante »* 1889, Wien-Monogr. *Ein weiterer Beitrag zur Pathologie u. Aetiologie d. Gangrène foudroyante.* Wien. Klin. Wochenschr., 1900, n. 46, inoltre sullo stesso argomento: Vedi (Ar. Kl. Ch. Vol, 59, 1899).

HOLMSEN F. *Ein Fall von b"sartigen puerperalinfection auf einem gasentwickelnden anaeroben Bacillus beruhend: « Gasgangrän ».* Norsk Magazin for Laegevidensk. Baumgarten's Jahresb. 64, p. 410.

JAKOWSKI. *Zur Aetiologie der Brustfellentzündung.* Zt. f. Klin. Mediz., vol. XX.

JUNGANO. *Caratteri biologici e culturali dei più frequenti anaerobii delle affezioni urinarie.* (Il Tommasi, 1907, n. 13).

KAMEN. *Zur Aetiologie der Gasphlegmone.* C. f. B., 1904, vol. 35, nn. 5-6.

KITASATO. *Ueber den Rauschbrand u. Kulturverfaren.* Zt. H., vol. VI, p. 105.

KITASATO u. WEYL. *Zur Kentniss der Anaeroben.* (Zt. H.), vol. 8, p. 41.

KLEIN. *Ein neuer Bacillus des malignen Oedems*. C. f. B., 1891, vol. X.
KLEIN E. *Ueber einen pathogenen anaeroben Darmbacillus: Bac. enteritidis sporogenes*. C. f. B., vol. 18, p. 737.
KROGIUS. *Om appendiciternas bakteriologi*. In Baumgartens. Iahresbericht, 1899.
KRÖPAC. *Ein Beitrag zur weiteren Differenzierung des Gangrène foudroyante*. Ar. Kl. C., vol. 62, p. 111, 1903.
KRÖNIG. *Ueber die Natur der Scheidekeime, speziell uber das Vorkommen anaerober Streptokokken im Scheidensecret Schwangerer*. (C. f. G.), 1895.
KERRY. *Ueber einen neuen path. anaerob. Bacillus*. Oesterr. Zeitschrift f. wissensch. Veterinärkunde, 1894.
H. LEGRAND u. AXISA. *Ueber Anaerobien im Eiter dysenterischen Leber und Gehirnabscesses in Aegypten*. (D. M. W.), 1905, n. 49.
LEWKOWICZ. *Recherches sur la flore microbienne de la bouche du nourrisson*. Ar. méd. e., 1901.
IDEM *Ueber die Reinkulturen des fusiformen Bacillus*. Cent f. B., vol. 41, p. 153.
LERAY. *A case of aërogenes capsulatus infection of the neck*. Journ. of the Americ. Ass., 1903.
LEVY. *Ein Fall. v. Gasabscess*. (Zt f. Ch.), vol. 32, 1891.
LEVY. *Ueber Pneumothorax ohne Perforation*. Arch. f. exper. Pharmakologie u. Pathologie, vol. 35, a. 1895.
LIBORIUS. *Beiträge zur Kenntniss der Sauerstoffbedürfnisses der Bacterien*. (Zt. f. H.), vol. 1.
LIPPMANN et FOISY. *De l'ostéomyelite à microbes anaérobies*. Baumgarten's Jahresb, 1902, p. 588.
LOWE W. J. and CARY C. A. *Infection of gunshot wound of the leg with the B. aërogenes capsulatus*. New-York Medical Record, LV, 1889.
LORRAIN M. *Etude bactériologique d'un cas de pleurésie putride*. Ar. Med. e., 1902, n. 6.
LUBINSCKI W. *Ueber Anaerobiose bei der Eiterung*. C. f. B., vol. 16, 1894.
LÜDERITZ. *Zur Kentniss der anaërober Bacterien*. (Zt. H.), vol. V, 1889.
MAY u. GEBHARD. *Pneumothorax durch gasbildende Bacterien*. (Ar. Kl. Med., 1898.
MENGE u. KRÖNIG. *Bakteriologie des weiblichen Genitalkanals*. Leipzig, 1897.
MONIER. *Contribution à l'étude des infections dentaires*. Thèse, Paris, 1904.
MONOD J. *Association bactérienne d'aérobies et anaérobies: gangrène du foie*. Soc. B., 1895.
MUSCATELLO e GANGITANO. *Ricerche sulla gangrena gassosa*. Rif. Medica, 1898, vol. III, pag. 471.
NORRIS. *A report on six cases in which the B. aërogenes capsulatus was isolated*. Riferito in C. f. B., vol. 30, p. 434.
OKADA. *Ueber einen roten Farbstoff erzeugenden Bacillus aus Fussbodenstaub*. C. f. B., vol. II, 1892.
ORI. *Sulla coltura degli anaerobi*. Atti Acc. dei fisiocritici, vol. 17, 1905.
PASSOW. *Ein Fall v. Gasphlegmone im rechten Schultergelenke*. Charité Annalen, vol. 20, p. 275.
PASTEUR. *Animalcules infusoires vivant sans gas oxygène libre et déterminant des fermentations*. (C. R. de l'Ac. des Sciences, 1861. Vol. 52).

Id. *Nouvel exemple de fermentation déterminée par des animalcules infusoires, pouvant vivre sans gas oxigène libre et en dehors de tout contacte avec l'aire de l'atmosphère.* (I. R. de l'Ac. des Sciences. Vol. 54, 1863).

Id. *Experiences et vues nouvelles sur la nature des fermentations.* Idem. Vol. 51. 1861.

Id *Recherches sur la putréfaction.* (Idem. Vol. 53, 1863).

Pende. *La piopneumocolecistite.* Bollettino della Società Lancisiana, anno 27, fascicolo 2°.

Id. *Contributo allo studio delle infezioni da Gasbacillus di Fränkel-Welch.* Bollettino della Società Lancisiana, anno 27, fascicolo 2°.

Perrone. *Contribution à l'étude bactériologique de l'appendicite.* A. I. P., 1905.

Politzer. *Ueber Pathologie, Diagnose u. operative Behandlung der Labyrintheiterungen.* Sitz. ber. d. Gesellsch der Aerzte in Wien v. 25 nov. 1904. Wiener Klin. Wochenschriff, 1904.

Pratt and Fulton. *Report of cases in which the B. aërogenes capsulatus was found.* Boston medic. Journ., 1900.

Rath. *Zur Bakteriologie der Gangrän.* C. f. B., 1899.

Reinbach. *Zur Aetiologie der Lungengangrän.* (C. f. all. P.) 1894.

Rist. *Sur quelques cas de balanites à microrganismes strictement anaérobies.* Soc. franç. de Derm. et Syph., 1904.

Id. *Etude bactériologique de sept cas de salpingite suppurée.* C. R. Soc. Biologie, 1902.

Id. *Anaërobies pathogènes et suppurations gangréneuses.* B. I. P., 1905.

Rist et Rendu. *Etude clinique et bactériologique sur trois cas de pleurésie putride.* Bull. et Mém. Soc. Méd. hôp. Paris, 1898.

Rist et Mouchette. *Etude bactériologique sur quelques cas d'infections puerpérales post-abortives.* C. R. Soc. Biol., 1902.

Renvers. *Casuistik u. Behandlung der Empyeme.* Charité Annalen, volume 16, 1889.

Rohrer. *Ueber die Pathogenität der Bakterien bei eitrigen Prozessen des Ohres.* D. m. W., 1888, n. 44.

Roger. *Quelques effets des associations microbiennes.* Soc. B., 19 gennaio 1889.

Rodella. *Ueber anaërobe Bacterien im normalen Säuglingsstuhle.* Zt. H., vol. 39.

Id. *Ueber die Bedeutung der im Säuglingssthule vorkommenden Mikroorganismen mit besonderer Berücksichtigung der anaëroben Bacterien.* Zt. H., vol. 41.

Id. *Ueber anaerobe Mundbacterien und ihre Bedeutung.* A. f. Hg., vol. 53.

Id. *Sur la différentiation du* Bac. putrificus coli *Bienstock et des bacilles anaérobies tryptobutyriques* (Achalme). A. I. P., 1905.

Rosenthal. *Symbiose satellique du streptobacille fusiforme et d'un microbe anaérobie.* (Soc. B.), 1901, Paris, pag. 322.

Roux L. *Anaërobe Bacterien als Ursache von Necrose u. Eiterung beim Rind.* C. f. B., vol. 39.

Russ K. *Ueber ein Influenzabacillen ähnliches anaërobes Stäbchen.* Centralbl f. B., vol. 39, 1905,

Sandler A. *Ueber Gasganyrän u. Schaumorgane* (C. f. all. P.) 1894.

SANFELICE. *Untersuchungen über anaëroben Microorganismen*. Zt. H., vol. XIV.

SANSONI e FORNACA. *Su di un particolare bacillo gassogeno isolato dal contenuto gastrico*. La Clinica Medica Italiana, 1899.

SCHATTENFROH u. GRASSBERGER. *Ueber Buttersäuregährung. I. Abhandlung*. A. f. H., vol. 37.

SCHUPFER. *Sopra un nuovo Bacillo anaerobio patogeno per l'uomo*. Policlinico, Sez. medica, 1905.

SILBERSCHMIDT. W. *Bakteriologisches über einige Fälle v. Gangrène foudroyante, von Phlegmone u. v. Tetanus beim Menschen*. Zt. H., volume 41.

STERN. *Contribution to the bacteriology of otitis media purulenta*. Arch. of Otology, 1896.

STOLZ. *Die Gasphlegmone des Menschen*. (B. Kl. Ch.), vol. 33.

TAVEL. *Ueber Pseudotetanusbacillus des Darmes*. C. f. B., vol. 23.

TAVEL e LANZ. *Ueber die Aetiologie des Peritonitis*. Mitthelungen aus Klinischen u. Medizinischen Instituten der Schweiz, 1893.

TAROZZI. *Sulla possibilità di coltivare facilmente all'aria in cultura pura i germi anaerobii*. Atti R. Acc. dei fisiocritici, vol. 15. Siena, 1905.

ID. *Osservazioni sulla natura dei fenomeni che determinano la esigenza anaerobica nelle culture dei germi anaerobici*. Atti R. Acc. dei fisiocritici, vol. 13.

ID. *Ueber ein leicht in anaërober Weise ausführbares Kulturmittel von einigen bis jetzt für strenge Anaëroben gehaltene Keime*. C. f. B., vol. 38, 1905.

THIROLOIX. *Examen bactériologique du sang de deux malades atteints de rhumatisme articulaire aigu*. Soc. B., 1897.

TRIBOULET et COYON. *Note sur la bactériologie du rhumatisme articulaire aigu franc*. S. m. Hôp., 1897.

TISSIER. *Recherches sur la flore intestinale normale et pathologique du nourrisson*. Dissert., Paris, 1900.

ID. *Etude sur une variété d'infection intestinale chez les nourrissons*. A. I. P, 1905.

ID. *Répartition des microbes dans l'intestin des nourrissons*. A. I. P.. 1905.

TIZZONI e CATTANI. *Sull'attenuazione del B. del tetano*. La Riforma Medica, 1891, n. 89.

UFFENHEIMER. *Ein neuer gaserzeugender Bacillus*. (B. z. P. An.), 1902, vol. 31, p. 383.

VEILLON et ZUBER. *Recherches sur quelques microbes strictement anaérobies et leur rôle en pathologie*. Ar. méd. e., 1898.

VEILLON. *Sur un micrococque strictement anaérobie dans les suppurations fétides*. C. R. Soc. Biologie, 1903.

ID. *Les microbes anaérobies en pathologie*. XIII Congrès intern. de médec., Paris, 1900.

VEILLON et MORAX. *Péridacryocistite gangreneuse*. Ann. d'oculistique, 1900.

VEILLON et HALLÉ. *Gangrène disséminée de la peau chez les enfants*. Ann. de Dermatologie e Syphil., 1901.

WALLGREEN A. *Ueber anaerobe Bakteria und ihr Vorkommen bei fötiden Eiterungen*. C. f. G., n. 42, p. 42.

WEICHSELBAUM. *Beiträge zur Kentniss der anaëroben Bakterien des Menschen* (C. f. B. Bd. 32, n. 6).

WELCH. *Morbid conditions caused by B. aër. capsulatus.* John Hopkin's Hopitals Bulletin, vol, 11.

WELCH a. FLEXNER. *Observations concerning the Bacillus aerogenes capsulatus.* Journ. of. experimentale medecine, vol. 1°, 1896, p. 5.

WESTERHOFFER. *Ueber Schaumorgane.* Vir. A., vol. 168, p. 185.

ID. *Weitere Beiträge z. Frage d. Schaumorgane.* Vir. A., vol. 170, p. 517.

WICKLEIN. *Drei Fälle v. Gasgangrän.* Vir. A., vol. 125, p. 75.

WIDAL et NOBÉCOURT. *Pleurite putrides sans gangrène du poumon ni de la plèvre.* Bull. et Mém. Soc. Méd. Hôpit. Paris, 1897.

WILLIAMS. *The B. aërogenes capsulatus in a case of suppurative pyelitis.* Johns Hopkins Hospital Bulletin, 1896, p. 66.

WRZOSECK. *Beobachtungen über die Bedingungen des Wachstums der obligatorischen Anaeroben in aerober Weise.* C. f. B., vol. 43, n. 7.

ID. *Ueber das Wachstum obligatorischen Anacrober auf Kulturmittel in aerober Weise.* Wiener Kl. W., 1905.

ZIERLER. *Bacteriologische Untersuchungen über Gangrän der Zahnpulpa.* C. f. B., vol. 26, 1899.

ZUBER et LEREBOULLET. *Cholécystites calculeuse.* Gaz. hebdomad. de médecine et chirurgie, 1898.

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA XVII.

Fig. 1ª. Bacillo *D* (caso n. 18) da coltura pura in agar glucosato.

Fig. 2ª. Bacillo *A* (caso n. 28) da coltura pura in agar glucosato.

Fig. 3ª. Essudato di una cavia inoculata sotto cute contemporaneamente con Bacillo *A* e con Stafilococco aureo.

Fig. 4ª. Bacillo *E* (caso n. 16) da coltura pura in agar glucosato.

Fig. 5ª. Bacillo *F* (caso n. 24) da coltura pura in agar glucosato.

Annali d'Igiene sperimentale (Nuova Serie)
Vol. XVII (1907). Tav. XVII.

GAUDIANI.
Ricerche dei germi anaerobi sulle suppurazioni.

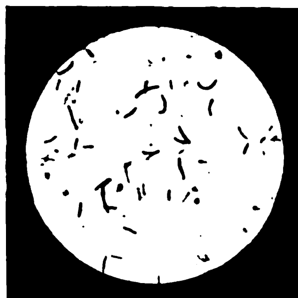


Fig. 1ª

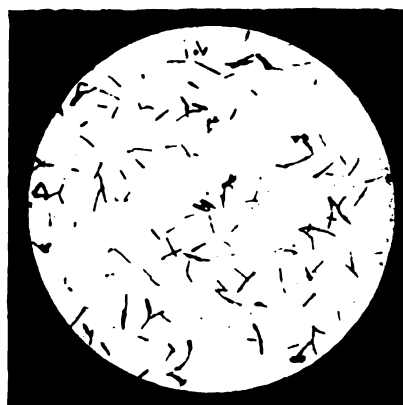


Fig. 2ª



Fig. 3ª



Fig. 4ª



neutri e per riscaldamento del residuo a 100° e 180°, le materie organiche subiscono una carbonizzazione e si alterano profondamente. Cosicchè le sostanze fisse lasciate da un'acqua, non rappresentano esattamente per qualità e per quantità le sostanze fisse quali e quante erano in soluzione e l'errore può raggiungere in media ± 5 gm. per 100,000.

Per la qual cosa, utilissimo sarebbe di trovare un metodo meno incerto, meno lungo ed anche possibilmente più esatto, poichè la determinazione del residuo è di grande importanza per la classificazione e per il giudizio della potabilità delle varie acque.

La conducibilità elettrica, sia detto subito, non può essere sostituita alla determinazione per pesata, poichè è difficile da essa risalire alla quantità esatta del miscuglio sconosciuto di sali in soluzione, essendo diverso in ciascuno dei componenti il grado di dissociazione. Quindi una relazione strettamente quantitativa tra conducibilità e concentrazione salina potrà esistere solo nel caso, impossibile, che i sali in soluzione abbiano lo stesso equivalente molecolare, siano tutti elettroliti e dissociati in egual grado.

Contuttociò, la conducibilità può rendere servigi di indiscutibile valore, sia perchè è determinazione che si eseguisce in pochi minuti, sia perchè nella maggior parte delle acque naturali i sali in soluzione hanno un equivalente molecolare oscillante entro limiti non molto ampi e sono tutti elettroliti e molto dissociati. Perciò se colla conducibilità non è possibile di determinare la quantità assoluta delle sostanze in soluzione, è possibile invece di determinarne la quantità approssimativa. La quale si ottiene, espressa in milligrammi equivalenti per litro, moltiplicando il potere conduttivo specifico $\varkappa$, determinato alla temperatura ordinaria, per 10,000 (1). Poichè il potere conduttivo equivalente Λ dei diversi elettroliti in soluzione diluita, per es. $N/_{100}$, oscilla intorno a 100 e poichè la concentrazione η è uguale a $\frac{\varkappa}{\Lambda}$. Una volta noto il potere conduttivo, si può conoscere la concentrazione, espressa in grammi equivalenti in un centimetro cubico, dividendolo per 100 e si possono avere i milligrammi equivalenti approssimati per litro moltiplicando la conducibilità per 10,000, oppure moltiplicando $\frac{}{100}$ per 10^6.

---

(1) KOHLRAUSCH und HOLBORN. *Das Leitvermögen der Elektrolyte....* 1898, p. 131.

Per esempio: la conducibilità $\varkappa$ di una soluzione 5 % di cloruro di potassio a 18° è uguale a $10^{4}691$ e la conducibilità equivalente è eguale a 99.9.

$$\eta = \frac{10^{4}690}{100} = 0.000000690$$

rappresenta i milligrammi equivalenti in un centimetro cubico e

$$0.0000690 \times 10000 = 0.690 \quad \text{ovvero} \quad \frac{10^{4}690}{100} = 10^{6}690 \times 10^{6} = 0.690$$

rappresentano i milligrammi equivalenti in un litro. Ed in realtà, una soluzione 5 % di cloruro di potassio corrisponde precisamente ad una quantità di milligrammi equivalenti per litro di 0.691.

E se le sostanze in soluzione non siano altro che cloruri, solfati, carbonati e nitrati dei metalli non nobili, si può avere approssimativamente la loro quantità, espressa im milligrammi per litro, moltiplicando il potere conduttivo specifico $\varkappa$ per 750,000, ovvero $0.75 \times \varkappa \times 10^{6}$, poichè il peso equivalente dei sali suddetti è, per eccezione, più piccolo di 60 e più grande di 90 e quindi in media di 75 e non di 55, come aveva fin dal 1897 calcolato Lehnert (1).

Proseguendo nell'esempio scelto di sopra la massa del cloruro di potassio in un litro sarà data dalle espressioni seguenti:

$$10^{4}.690 \times 750.000 = 51.75 \quad \text{oppure} \quad 0.75 \times 10^{4}.690 \times 10^{6} = 51.75$$

massa un pochino superiore alla reale, poichè in un litro ne erano disciolti gm. 50 soltanto.

Lévy ed Henriet (2), per la stessa determinazione, sono partiti dalla considerazione che se tra la resistenza specifica offerta da un'acqua ed il residuo secco esiste vera proporzionalità, il prodotto tra l'una e l'altro deve essere una costante; per cui dividendo questa costante per la resistenza si deve avere il residuo secco. E la costante fu da loro determinata facendo la media delle resistenze specifiche offerte dalle sorgenti della Vanne, moltiplicandole col residuo medio a 180° trovato per pesata nelle stesse acque ed ottennero la cifra 686.488. Dividendo questa costante per la resistenza specifica offerta da un'acqua qualsiasi, si deve ottenere approssimativamente il residuo secco a 180°.

(1) Dissertazione alla Università di Erlangen, 1897.
(2) *Annales de l'Observ. de Montsouris*, 1903, p. 147.

Con questa costante gli stessi Lévy ed Henriet determinarono il residuo delle varie sorgenti della Vanne ed ottennero risultati molto soddisfacenti, quali appariscono nella seguente tabella:

SORGENTI	Resistenza specifica	Residuo secco mg. per litro		
		Trovato	Calcolato	Differenza
Buillard.	2404	277	286	— 9
Armantière principale	2727	250	252	— 2
» aval.	2689	255	255	0
Cérilly	2535	267	271	— 4
Drain Flacy.	2238	293	290	— 6
Siphon Chigy	2581	265	266	— 1
Pâtures	2516	273	270	+ 3
Source Maroy	2479	281	277	+ 4
Usine Chigy.	2370	292	290	+ 2
Drain Maroy	2494	276	275	+ 1
Saint Philibert et Saint-Marcouf .	2644	258	260	— 2
Usine Forge.	2570	264	267	— 3
Maillot	2685	265	256	+ 9
Noé.	2706	252	254	— 2

Dinanzi a coteste considerazioni ed a cotesti risultati mi è parso interessante di conoscere quale dei due modi di calcolare il residuo, dalla conducibilità o resistenza, fosse migliore e contemporaneamente quale fiducia si dovesse accordare ai risultati ottenuti e quali nuove ed interessanti cognizioni risultassero dall'applicazione di cotesto dato fisico all'analisi delle acque.

Per la qual cosa mio primo pensiero è stato quello di estendere la determinazione a diversi tipi di acque potabili e minerali, di alcuni dei quali almeno non si conosce il comportamento verso la corrente elettrica e non si sa se formino eccezione a cui si possa apportare un rimedio.

La conducibilità fu determinata con un apparecchio controllato di Kohlrausch, la descrizione del quale e del modo di usarlo si trova

diffusamente nei vari trattati pratici (1). Mi dispenso quindi di fare cosa inutile per la maggior parte dei lettori, affermando di aver seguìto in tutto e per tutto le indicazioni date dal Kohlrausch; solo ho scelto la temperatura di 18° invece di quella ordinaria per la determinazione, perchè questa nel nostro clima varia fortemente e le variazioni influenzano troppo la conducibilità.

Il residuo per pesata è stato determinato per evaporazione di mezzo litro d'acqua in capsula di platino, facendo in modo di non oltrepassare lo spazio di una giornata e facendo le pesate tutte in scatola di cristallo sottile.

Nelle seguenti tabelle ho riunito i risultanti delle mie determinazioni.

---

(1) Kohlrausch und Holborn. Opera citata, pag. 42 ed altrove.
Ostwald e Luther. *Manuel pratique des mesures physico-chimiques*, 1904, p. 439.
Celli. *Manuale dell'Igienista*, 1907, vol. I, p. 754.

N. d'ordine	INDICAZIONE SULLE ACQUE	Residuo per pesata in 100,000 p.		Dell'acqua intera			
		A 100°	A 180°	W	κ	Residuo calcolato dalla conducibilità	Residuo calcolato dalla resistenza
	Potabili.						
1	Marcia - Aprile 1906	32.34	31.68	2144.7	0.0004663	34.97	32.01
2	» - » »	..	31.78	2153.5	0.0004643	34.82	31.87
3	» - Maggio »	32.40	32.16	2113.0	0.0004732	35.49	32.48
4	» - Giugno »	..	..	2083.3	0.0004800	36.00	32.95
5	» - Gennaio 1907	30.96	30.02	2184.3	0.0004577	34.32	31.43
6	» - Maggio »	30.04	29.66	2123.5	0.0004709	35.32	32.32
7	Felice - Giugno 1906	35.68	35.48	2139.1	0.0004674	35.05	33.66
8	» - » »	35.66	35.36	2053.6	0.0004869	36.51	33.42
9	» - » »	35.70	35.50	2039.1	0.0004904	36.77	33.66
10	» - Febbraio 1907	35.70	35.70	2148.7	0.0004654	·32.90	31.95
11	Trevi - Giugno 1906	36.08	36.00	2048.7	0.0004881	36.60	33.50
12	» - » »	36.08	35.90	2058.8	0.0004856	36.42	33.34
13	» - Febbraio 1907	..	35.40	2133.6	0.0004686	35.14	32.18
14	Sorgiva in Bussi	17.46	17.32	4134.6	0.0002418	18.12	16.59
15	» in Anzio	34.90	34.80	2049.0	0.0004880	36.60	32.92
16	» in Gallese	23.28	22.60	4435.8	0.0002252	16.89	15.47

N. d'ordine	INDICAZIONI SULLE ACQUE	Residuo per pesata in 100,000 p.		Dell'acqua intera			
		A 100°	A 180°	W	χ	Residuo calcolato dalla conducibilità	Residuo calcolato dalla resistenza
17	Sorgiva in Gallese	22.72	22.52	4492.8	0.0002226	16.69	15.52
18	» in Corchiano	21.04	20.80	5517.5	0.0001813	13.59	12.44
19	Lago di Vico	20.95	21.08	3276.0	0.0003052	22.89	20.95
20	Artesiana in Puglia.	71.46	71.36	969.5	0.0010314	77.36	70.82
21	» »	101.92	100.88	622.8	0.0016056	120.43	110.23
22	» »	106.92	105.88	608.1	0.0016444	123.33	112.88
23	» »	146.60	137.88	547.3	0.0018271	137.03	125.42
24	Selenitosa presso Todi	61.04	58.76	1312.1	0.0007621	57.15	52.32
25	» »	51.88	50.88	1318.8	0.0007582	56.87	52.05
	Minerali.						
26	Acidula ferrugginosa Magliano Sabina. .	154.20	153.50	441.5	0.0022650	169.88	155.48
27	» solforosa Nepi	61.04	61.00	1372.8	0.0007284	54.63	50.00
28	» » »	56.18	..	1395.6	0.0007165	53.74	49.19
29	» » »	55.00	55.00	1467.9	0.0006744	50.58	46.76
30	» » Viterbo	..	259.14	367.7	0.0027196	203.97	186.70
31	Fiuggi	3.56	3.44	11493.1	0.0000807	4.60	5.97
32	Sardara (Sardegna)	250.52	248.32	285.0	0.0035087	263.15	240.88

Questi risultati mostrano, innanzi tutto, che nella maggioranza delle acque esaminate i residui calcolati dalla conducibilità o dalla resistenza si approssimano grandemente a quelli ottenuti per pesata. Fanno eccezione solo alcune acque potabili e la maggior parte delle acque minerali, come, meglio che dalla precedente, si può vedere dalla seguente tabella, ove sono disposte per ordine le differenze tra i residui calcolati e quelli per pesata:

N. d'ordine	Differenze nel residuo calcolato dalla conducibilità	Differenze nel residuo calcolato dalla resistenza	N. d'ordine	Differenze nel residuo calcolato dalla conducibilità	Differenze nel residuo calcolato dalla resistenza
1	+ 3.29	+ 0.33	22	+ 17.45	+ 7.00
7	— 0.43	— 1.81	23	— 0.85	— 12.46
11	+ 0.60	— 2.50	24	— 1.61	— 6.44
14	+ 0.80	— 0.73	25	+ 5.99	+ 1.17
15	+ 1.80	— 1.88	26	+ 6.38	+ 1.98
16	— 5.71	— 7.13	27	— 6.37	— 10.00
17	— 5.83	— 7.00	29	— 4.42	— 8.21
18	— 7.21	— 8.36	30	— 55.17	— 72.44
19	+ 1.61	— 0.33	31	+ 1.16	+ 2.53
20	+ 6.00	— 0.54	32	+ 14.83	— 7.44
21	+ 19.55	+ 9.35			

Cioè in 21 determinazioni di acque diverse le differenze sono distribuite nell'ordine seguente:

	Differenze dalla conducibilità ±	Differenze dalla resistenza ±		Differenze dalla conducibilità ±	Differenze dalla resistenza +
Sotto l'unità	4	4	Tra 5 e 6 .	3	0
Tra 1 e 2 .	4	4	» 6 e 7 .	3	1
» 2 e 3 .	0	2	» 7 e 8 .	1	4
» 3 e 4 .	1	0	» 8 e 9 .	0	2
» 4 e 5 .	1	0	Da 10 in su.	4	3

Da qui si apprende che anche per la grandezza delle differenze i due modi di calcolare si possono dire presso a poco eguali, mentre

lo stesso non si può dire del senso delle differenze. Poichè i residui ottenuti calcolandoli dalla conducibilità eccedono, in maggioranza; quelli calcolati dalla resistenza difettano:

	Residui dalla conducibilità	Residui dalla resistenza
+	12	6
—	9	14

Ciò vuol dire che per alcune acque l'equivalente molecolare medio 75 è troppo elevato, mentre la costante 686,488 è troppo bassa. Quindi a correggere in parte questi difetti si potrebbe scegliere un equivalente molecolare medio più basso, 70 o 65, ed una costante più elevata; però i risultati in difetto e quelli pressochè pari aumenterebbero di valore o eccederebbero in senso contrario. Perciò a me sembra che non valga affatto le pena di cambiare nè l'uno nè l'altra poichè i residui in tal modo calcolati, difficilmente potranno raggiungere un'approssimazione maggiore, la conducibilità essendo troppo legata, alla composizione dell'acqua ed al grado di dissociazione dei sali disciolti. Difatti ogni acqua è un'individualità a sè, comunque il residuo corrisponda ad altre, perchè i sali in soluzione possono essere diversi per qualità, per la proporzione nella quale entrano nella mescolanza; onde una differenza nella conduttività elettrica.

A questa condizione non v'ha rimedio da opporre; mentre un rimedio è sempre possibile in quei casi nei quali i sali in soluzione non sono dissociati a quel grado richiesto perchè si avverino le condizioni poste per base del calcolo del residuo, sia per la forte concentrazione, sia per la non facile dissociazione. Ho potuto osservare difatti un'acqua che dava un residuo calcolato molto inferiore a quello trovato, modificarsi grandemente, per rispetto alla conducibilità, per diluizione a metà con acqua distillata purissima e rientrare nella regola ordinaria. Questa è l'acqua, segnata nella prima tabella col n. 18, proveniente da terreno vulcanico, quale è quello di Corchiano, nel circondario di Viterbo:

	Non diluita	Diluita ½
Residuo per pesata a 180°..........	20.80	—
Resistenza specifica a 18°..........	5517.5	6647.8
Conducibilità specifica..............	0.0001813	0.0001504
Residuo calcolato dalla conducibilità.	13.59	22.56
Residuo calcolato dalla resistenza...	12.41	20.64

Ciò dimostra che in quest'acqua vi era uno o più sali poco dissociabili, diversi da quelli che si trovano nelle acque potabili ordinarie e probabilmente silicati semplici o complessi, poichè in essa abbondante era la quantità di silice e perchè comune aveva il comportamento con altre acque, pure contenenti molta silice, quali quelle notate ai nn. 16 e 17. Ma, la diluizione non si può applicare a tutte le acque e sempre; poichè aumentando la dissociazione aumenta la conducibilità e contemporanoamente aumenta il residuo, calcolato colle stesso equivalente molecolare medio 75. Inoltre diminuisce la resistenza ed aumenta il residuo, calcolato sempre dalla stessa costante, rimanendo sempre invariata la tendenza a dare, nel primo caso, risultati in eccesso e nel secondo in difetto. Così l'acqua Marcia e l'acqua delle Ferrarelle dànno i risultati seguenti:

Marcia.

	Non diluita	Diluita ½
Residuo per pesata a 180°..........	29.66	—
Resistenza specifica a 18°..........	2123.5	3947.1
Conducibilità specifica..............	0.0004709	0.0002533
Residuo calcolato dalla conducibilità.	35.31	37.98
Residuo calcolato dalla resistenza..	32.32	34.78

Ferrarelle

	Non diluita	Diluita ½
Residuo per pesata a 180°..........	139.60	—
Resistenza specifica a 18°..........	537.52	1000.7
Conducibilità specifica..............	0.0018604	0.0099920
Residuo calcolato dalla conducibilità.	139.53	148.88
Residuo calcolato dalla resistenza...	127.71	137.20

i quali confortano a meraviglia le considerazioni e le previsioni or ora fatte.

Da ciò che è stato esposto, si può concludere: che il residuo delle acque è necessario ancora che sia determinato per pesata, poichè calcolandolo dalla conducibilità o resistenza si può cadere in una delle eccezioni notate e quindi in un errore, che nella maggioranza dei casi non eccede o di poco l'errore ± 5 al quale si può andare incontro nella determinazione per pesata. Quindi, *nelle analisi delle acque a me sembra che, oltre al residuo per pesata, debba entrare anche il residuo calcolato colla conducibilità o colla resistenza, perchè può essere non solo un'utile conferma di quello ottenuto per pesata, ma può dare utili*

indicazioni sulle sostanze in soluzione, per lo meno, se esse sono poco o molto dissociate. Ma dove la conducibilità riesce di una utilità indiscutibile è nell'accertamento della origine di varie sorgenti, quando ciò non si possa decidere dal residuo per pesata e quando non si voglia procedere ad una analisi dettagliata.

Il caso seguente, capitato a chi scrive, dà un'idea esatta di cotesta utilità. Si trattava cioè di decidere se il lago di Vico alimentasse una sorgente in Corchiano di cui l'acqua si beve dalla cittadinanza attualmente e presso cui dovevano farsi dei lavori di non piccola entità. All'analisi le due acque dettero i risultati, dei quali alcuni ne trascrivo qui :

	Acqua Corchiano	Vico
Residuo secco a 180°	20.80	21.08
Resistenza specifica a 18°	5517.5	3276.0
Conducibilità specifica	0.0001813	0.0003052
Residuo calcolato dalla conducibilità	13.59	22.89
Residuo calcolato dalla resistenza	12.44	20.95

I quali non lasciano alcun dubbio sulla origine propria delle due acque e sulla loro diversità, tenendo conto soltanto della resistenza o della conducibilità elettrica ; mentre a ciò non avrebbe potuto condurre il residuo solo, pressochè eguale in ambedue.

Istituto d'Igiene della Regia Università di Roma

Sulla deviazione del complemento nella malaria umana

per il dott. DANTE DE BLASI.

Bordet e Gengou nel 1901, applicando a diverse infezioni un'esperienza fatta dal primo di essi, l'anno avanti, per il colera, provarono che il complemento contenuto nel siero fresco di cavia, messo a contatto con differenti specie di bacilli e coi rispettivi sieri di animali immunizzati o di persone convalescenti, resta fissato ad essi e non dimostra più la sua azione attivatrice quando ai detti elementi si aggiungono ancora delle emazie ed il corrispondente siero emolitico, prima reso inattivo col riscaldamento.

Tale esperienza ingegnosa fu eseguita allora per addurre una prova a conforto della unicità del complemento e per dimostrare come questo venga assorbito dalle sensibilizzatrici: al presente essa è stata già assunta al valore di una importante prova diagnostica, come risulta dal seguente brevissimo cenno intorno alle sue applicazioni.

Nel 1903 lo Gengou avvertì come il metodo adoperato prima per sostenere l'unicità del complemento possa servire a dimostrare sia la presenza di certi *antigeni*, cioè sostanze capaci di provocare nell'organismo animale la formazione di anticorpi, sia anche la presenza di una specie di anticorpi, cioè delle *sensibilizzatrici*, dette anche *ambocettori.* Lo stesso Gengou riconobbe altresì che come antigeni si comportano non solo i batteri e le cellule dell'organismo, ma anche il siero di sangue, il latte ed altri liquidi contenenti sostanze proteiche.

Più tardi con questo metodo fu riconosciuta nel siero di cavie inoculate con bacilli della tubercolosi aviaria, la presenza di anticorpi attivi sui bacilli della tubercolosi umana uccisi (Bordet e Gengou) o vivi (Wassermann e Bruck, Citron).

Maggiore importanza acquistò il metodo dopo che Wassermann, Neisser e Bruck ottennero in molti casi la fissazione del complemento da parte di estratti di organi di feti eredosifilitici (antigene) mescolati col siero (anticorpo) di scimmie precedentemente trattate con materiale sifilitico. Il fatto

fu confermato per le ricerche eseguite col siero di persone sifilitiche da Detre, Wassermann, Neisser, Bruck e Schucht, Citron, e col liquido cerebro-spinale di persone affette da paralisi progressiva da Wassermann e Plaut, Marie e Levaditi, Morgenroth e Stertz, e con quello di tabetici da Schütze, Bruck, Marie e Levaditi, Morgenroth e Stertz. Così via via crebbe il numero delle applicazioni, e la fissazione del complemento fu dimostrata anche per il tifo, per il paratifo, per la setticemia e la peste dei suini, per il mal rossino, per gli streptococchi, per i gonococchi, per la pertosse, per il vaccino, per la lebbra, per le tripanosomiasi da tzetzè, per la rabbia, per la tubercolosi miliare, per la lue cerebrale, per la meningite, per la leucemia, per i tumori maligni.

Il fenomeno consiste in questo: l'*antigene* (batteri, emazie, estratti di organi, ecc.), ed il corrispondente *anticorpo* (ottenuto da siero di animali inoculati rispettivamente con batteri, con emazie, con estratti di organi, ecc., e riscaldato per ½ ora a 56°-58° C.), mescolati ciascuno per sè con una determinata quantità di *complemento* (siero fresco di un animale sano, p. es. di cavia), rimangono nella miscela liberi l'uno accanto all'altro; laddove se si mescolano l'antigene e l'anticorpo insieme col complemento, questi tre elementi formano un complesso nel quale il complemento resta come imprigionato, ossia, adottando il termine generalmente in uso, *il complemento rimane fissato*. Per dimostrare che ciò effettivamente avviene si ricorre appunto alla prova di Bordet e Gengou.

Una proprietà fondamentale del complemento è quella di riattivare un siero specificamente emolitico per una data specie di emazie, il quale sia stato precedentemente inattivato col riscaldamento; quindi per assicurarci se nella mescolanza « antigene + ambocettore + complemento » il complemento è stato fissato, basterà aggiungere questa mescolanza ad una determinata diluzione di siero emolitico inattivato, nella quale siano sospese emazie della stessa specie di quelle che servirono ad inoculare l'animale fornitore del siero. Se il complemento è rimasto fissato all'antigene e all'ambocettore insieme, esso non sarà più libero e quindi non potrà ridonare al siero emolitico inattivato il suo pristino potere di dissolvere le emazie; in altre parole, *non avverrà l'emolisi*. Se per contrario il complemento non è stato fissato, esso sarà libero e capace di riattivare il siero emolitico, ossia l'*emolisi avverrà*. Nel primo caso, quando l'emolisi non avviene, il complemento è come distratto, deviato dalla sua funzione attivatrice: perciò il fenomeno prende anche il nome di *deviazione del complemento*.

Importante era di ricercare se il fenomeno di Bordet e Gengou si riscontrasse anche nella infezione malarica dell'uomo, specialmente nei

casi di malaria latente. Il trovare un metodo, che valesse a diagnosticare con sicurezza tali casi, è da molti anni oggetto di ricerche inspirate e in parte personalmente eseguite in questo Istituto da A. Celli e dai suoi allievi Casagrandi, Carducci, De Blasi (1); e dopo i molti tentativi riusciti infruttuosi, almeno per ciò che concerne l'applicazione pratica, era naturale tentare questo nuovo sussidio diagnostico.

Per eseguire la prova di Bordet e Gengou, bisogna avere pronto *un buon siero emolitico* per una data specie di emazie, ed il *materiale nel quale esistono o si presumono esistenti gli antigeni specifici.*

Nel caso mio ho adoperato per lo più il siero emolitico di conigli, trattati con parecchie inoculazioni di sangue di bue; qualche volta il siero di conigli inoculati più volte con sangue di pecora.

Come materiale contenente *antigeni* ho adoperato il sangue di un malato di terzana lieve, ricchissimo di parassiti intraglobulari (4-5 in media per ogni campo microscopico corrispondente ad un ingrandimento di 750 diametri), e quello di un malato d'infezione malarica mista, terzana ed estivautunnale, con numero piccolo, ma non troppo scarso, di parassiti della terzana lieve e di semilune.

Per trasformare il sangue in uno stato tale da potersi conservare per lungo tempo, pur rimanendo sempre adatto alla prova di Bordet e Gengou, lo lavavo prima tre volte con soluzione di NaCl 0.91 per cento sterilizzata, frapponendovi altrettante centrifugazioni, e poi lo dissolvevo in acqua distillata sterilizzata, evaporavo a bagnomaria a 37° C. e da ultimo essiccavo nel vuoto sopra acido solforico. Si ottiene così una massa rossa-bruna, lucente, di aspetto vitreo, la quale si polverizza assai facilmente in un mortaio di agata.

La polvere di sangue così ottenuta si conserva in boccettine di vetro scuro con tappo smerigliato e messe in un recipiente che contenga del cloruro di calcio o altra sostanza molto igroscopica.

I presunti *anticorpi* ricercavo nel siero dei malarici, raccolto da una vena del braccio, per lo più dalla mediana cefalica, in palloncini Tizzoni-Centanni sterilizzati, per farlo coagulare e ricavarne il siero; oppure qualche volta in palloncini contenenti palline di vetro sterilizzati per defibrinarlo e separarne poi il siero mediante la centrifugazione.

La polvere di sangue, ogni volta che occorreva, era pesata nella quantità necessaria per fare una sospensione nel rapporto 1 : 30 in soluzione di NaCl 0.91 per cento. Messa la polvere pesata in una provetta, veniva aggiunta la quantità richiesta di soluzione a gocce a gocce, stemperando continuamente per mezzo di una bacchetta di vetro. La sospensione così fatta tenevo a 37° C. per 6 ore prima di adoperarla: al fondo della provetta restando sempre una certa quantità di precipitato brunastro, centrifugavo per breve tempo e poi decantavo.

È superfluo che io mi diffonda ad esporre i particolari tecnici, perchè questi risultano dall'esame delle tabelle che seguono. Da queste si vede che il

(1) Atti della Società per gli studi della malaria, vol. III, IV, VII.

volume totale, nel quale ho messo a reagire i diversi elementi che concorrono alla produzione del fenomeno, è stato di 2 cmc., tranne un caso, nel quale con intenzione scelsi 3 cmc.

Appare inoltre dalle tabelle, che seguiranno, come non sia stata omessa nessuna delle prove di riscontro destinate ad accertare:

1° *che il siero nel quale si sospettano degli anticorpi non produca già di per sè il fenomeno della deviazione, e che non sia esso stesso emolitico*;

2° *che identicamente si comporti il materiale prescelto come antigene*;

3° *che il siero emolitico conservi tal suo potere in grado piuttosto forte e che, privatone per il riscaldamento, lo riacquisti del tutto, o quasi del tutto, per l'aggiunta di siero fresco (complemento) di animale adatto*;

4° *che le emazie adoperate per la miscela emolitica e destinate ad essere disciolte in caso di fenomeno negativo, o a rimanere intatte in caso di fenomeno positivo, si conservino realmente nel mestruo adoperato per le varie prove.*

***

In una prima esperienza, fatta col siero di un malato di terzana lieve eseguii, contemporaneamente alle prove con polvere di sangue terzanario e con siero di un malarico terzanario, delle *prove incrociate con polvere di sangue normale e con siero di persona sana.*

Tabella I. — *Malato di terzana lieve in atto, chinizzato.*

	Sospensione di polvere di sangue		Siero di sangue riscaldato		Siero fresco di cavia (complemento)	Soluzione di NaCl 0.91 %	Miscela emolitica (Sangue + siero emolitico, riscaldato, diluito 1:250)	Emolisi osservata
	con parassiti	normale	malarico	normale				
1	0.20	—	0.20	—	0.10	0.50	1.00	Quasi completa
2	0.20	—	0.10	—		0.60		Id.
3	0.20	—	—	0.20		0.50		Id.
4	0.20	—	—	0.10		0.60		Id.
5	—	0.20	0.20	—		0.50		Id.
6	—	0.20	0.10	—		0.60		Id.
7	—	0.20	—	0.20		0.50		Id.
8	—	0.20	—	0.10		0.60		Id.
9	—	—	0.20	—	0.10	0.70	1.00	Quasi completa
10	—	—	—	0.20	0.10	0.70		Id.
11	—	—	0.20	—	—	0.80		—
12	—	—	—	0.20	—	0.80		—
13	0.20	—	—	—	0.10	0.70		Quasi completa
14	—	0.20	—	—	0.10	0.70		Id.
15	0.20	—	—	—	—	0.80		—
16	—	0.20	—	—	—	0.80		—
17	—	—	—	—	0.10	0.90		Quasi completa
18	—	—	—	—	—	1.00		—
	2h a 37°C							
	1h a 37°C							

Da questa tabella risulta: 1° che il siero terzanario mescolato con polvere malarica terzanaria (n. 1-2) o con polvere di sangue normale (n. 5-6) non produce alcun accenno di deviazione del complemento; 2° che il siero normale non produce il detto fenomeno nè con polvere malarica (3-4) nè con polvere di sangue normale (7-8). Era infatti necessario escludere che siero normale e polvere di sangue normale per loro conto deviassero il complemento; la qual cosa potei confermare anche con altre identiche prove, che ebbero esito concorde.

Fra le prove di riscontro, i nn. 9, 10, 13, 14 assicurano che nè i due sieri nè le due polveri deviano per sè soli; i nn. 11, 12, 15, 16 dicono che nè i sieri nè le polveri hanno azione emolitica; il n. 17 conferma il potere del siero emolitico adoperato, ed il n. 18 la buona conservazione delle emazie nel mestruo.

Trattandosi di ricerche iniziali e, come suol dirsi, d'orientamento, era ovvio il ritentare in altri casi le prove, modificando *la quantità assoluta e relativa degli elementi assunti come antigeni ed anticorpi.*

Perciò in un altro caso di terzana lieve, feci la esperienza riassunta sinotticamente nella seguente:

TABELLA II. — *Convalescente di terzana lieve che non prendeva più chinino da otto giorni.*

	Sospensione di polvere di sangue con parassiti della terzana lieve	Siero di sangue malarico, riscaldato	Siero fresco di cavia (complemento)	Soluzione di Na Cl 0.91 %	Miscela emolitica (sangue + siero emolitico, riscaldato, diluito 1:250)	Emolisi osservata
1	0.55	0.25	0.10	0.10		Completa
2	0.40	0.25	0.10	0.25		Id.
3	0.30	0.25	0.10	0.35	1.00	Id.
4	0.30	0.50	0.10	0.10		Completa
5	0.20	0.50	0.10	0.20		Id.
6	0.10	0.50	0.10	0.30		Id.
7	—	0.25	0.10	0.65		Completa
8	—	0.50	0.10	0.40		Id.
9	0.40	—	0.10	0.50		Completa
10	0.20	—	0.10	0.70		Id.
11	0.40	—	—	0.60	1.00	—
12	0.20	—	—	0.80		—
13	—	0.25	—	0.75		—
14	—	0.50	—	0.50		—
15	—	—	0.10	0.90		Completa
16	—	—	—	1.00		—

2h a 37° C

1h a 37° C

Da questa tabella si desume che, tenendo costante a 0.25 la quantità del siero malarico e variando da 0.55 a 0.30 la quantità della polvere (nn. 1, 2, 3), il fenomeno di Bordet e Gengou è negativo; che è del pari negativo se si mantiene costante a 0.50 la quantità del siero e si fa variare da 0.30 a 0.10 quella della polvere (nn. 4, 5, 6).

I nn. 7, 8, 9, 10 provano che nè il siero nè la polvere deviano per sè soli il complemento; i nn. 11, 12, 13, 14 dicono che nè il siero nè la polvere dimostrano potere emolitico; i nn. 15 e 16 accertano rispettivamente la bontà del siero emolitico e del complemento e la buona conservazione della emazie.

***

Un'altra causa capace di contribuire a nascondere il fenomeno poteva stare nella *scelta del complemento.* Nella ipotesi della pluralità dei complementi, poteva infatti immaginarsi che il complemento di cavia non fosse il più adatto ad essere deviato: perciò, in un altro caso di terzana, sperimentai così col complemento di cavia sana come con quello di coniglio e di uomo sani: avverto che mentre il primo si conserva bene per un paio di giorni, il secondo e il terzo devono essere adoperati freschissimi.

I risultati sono ordinati nella seguente

TABELLA III. — *Malato di terzana lieve, che nel giorno del salasso non febbricitava più da 12 giorni e non aveva preso chinino da 3 giorni.*

	Sospensione di polvere di sangue con parassiti della terzana lieve	Siero di sangue malarico riscaldato	Siero fresco (complemento)			Soluzione di NaCl 0.91 %	Miscela emolitica (sangue + siero emolitico, riscaldato, diluito 1 : 200)	Emolisi osservata
			Cavia	Coniglio	Uomo			
1	0.55	0.25	0.20	—	—	—		Completa
2	0.55	0.25	0.10	—	—	0.10		Id.
3	0.55	0.25	—	0.20	—	—		Id.
4	0.55	0.25	—	0.10	—	1.10	1.00	Id.
5	0.55	0.25	—	—	0.20	—		Id.
6	0.55	0.25	—	—	0.10	0.10		Id.
7	—	0.25	0.10	—	—	0.65		Completa
8	—	0.25	—	0.10	—	0.65		Id.
9	—	0.25	—	—	0.10	0.65		Id.
10	—	0.25	—	—	—	0.75		Id.
11	0.55	—	0.10	—	—	0.35		Completa
12	0.55	—	—	0.10	—	0.35	1.00	Id.
13	0.55	—	—	—	0.10	0.35		Id.
14	0.55	—	—	—	—	0.45		Id.
15	—	—	0.10	—	—	0.90		Completa
16	—	—	—	0.10	—	0.90		Id.
17	—	—	—	—	0.10	0.90		Id.
18	—	—	—	--	—	1.00		—

2h a 37° C

1h a 37°C

Questa tabella ci assicura che della mancanza del fenomeno di Bordet e Gengou non è causa la qualità del complemento, poichè nessuno dei tre complementi adoperati è deviato (nn. 1-6).

I nn. 7-10 provano che il siero malarico non devia per sè solo e non è emolitico; i nn. 11-14 provano lo stesso fatto per la polvere di sangue. I nn. 15-18 ci assicurano dell'azione del siero emolitico e della conservazione dell'emazie.

*
* *

Esclusi così i diversi dubbi che mi si presentavano, stabilii di proseguire le ricerche con uno *schema semplice*, simile a quello usato da altri autori. Questo schema è dato dalla seguente

TABELLA IV. — *Malato da un anno di malaria, con reperto di parassiti della terzana lieve e di semilune nel sangue: salassato prima della chinizzazione.*

	Sospensione di polvere di sangue con parassiti	Siero di sangue di convalescente di estivo-autunnale	Siero fresco di cavia (complemento)	Soluzione di NaCl 0.91 %	Miscela emolitica (sangue + siero emolitico, riscaldato, diluito 1:250)	Emolisi osservata
1	0.20	0.20	0.05	0.55		Traccie
2	0.20	0.10	0.05	0.65	1.00	Id.
3	0.20	0.05	0.05	0.70		Incompleta
4	—	0.20	0.05	0.75		Traccie
5	—	0.20	—	0.80		—
6	0.20	—	0.05	0.75		Quasi completa
7	0.20	—	—	0.80	1.00	—
8	—	—	0.05	0.95		Completa
9	—	—	—	1.00		—

2h a 37° C

1h a 37° C

In questa tabella si riscontra che, adoperando 0.20 o 0.10 di siero malarico, la deviazione del complemento è quasi completa (nn. 1, 2) e che essa avviene anche, benchè in minor grado, con 0.05 di siero (n. 3).

I nn. 6 e 7 dimostrano che la polvere non devia per conto suo e non è emolitica; mentre i nn. 8 e 9 ci assicurano della bontà del siero emolitico e delle emazie, e il n. 5 esclude che il siero malarico abbia potere emolitico.

Ma se guardiamo al n. 4, ci accorgiamo subito che *il siero malarico già di per sè solo inibisce l'emolisi. Questo fatto toglie ogni valore all'apparente esito positivo notato ai nn. 1-3.*

Tanto maggiore importanza acquista tale osservazione, in quanto nel siero di altri due malarici ho osservato l'identico fenomeno, ed il Levi (1) ha visto lo stesso fatto nel siero di animali affetti da diverse tripanosomiasi.

Nel mio studio sulle emolisine intraglobulari nella malaria umana, ebbi già ad avvertire un fenomeno consimile, vale a dire il siero malarico, ed anche il siero normale, messo a contatto con le emolisine intraglobulari estratte e con delle emazie integre, poneva ostacolo alla manifestazione dell'emolisi; ed interpretai il fatto come *un'azione protettiva del siero sulle emazie*. Ma essendo le condizioni di quelle mie esperienze differenti dalle esperienze esposte in questa memoria, non ho alcuna ragione per paragonare l'azione inibitrice del siero malarico nella prova di Bordet e Gengou a quella da me osservata nelle ricerche sulle emolisine intraglobulari.

Ho potuto ripetere la prova di Bordet e Gengou in 8 casi, e precisamente:

in 2 malati di terzana lieve in atto, chinizzati;

in 2 malati di terzana lieve, che non avevano più febbre rispettivamente da 10 e da 12 giorni, ed ai quali era stata interrotta temporaneamente la chinizzazione tre giorni prima del salasso;

in 1 convalescente di terzana lieve, che non prendeva più chinino da otto giorni;

in 1 malato di estivautunnale in atto, che fu chinizzato dopo la presa del sangue;

in 1 malato di estivautunnale, chinizzato, che non febbricitava più da 12 giorni;

in 1 malato, che aveva contratto la malaria un anno avanti, ed era stato quasi tutto l'anno tormentato dalle febbri, avendo preso poco o punto chinino e senza regola alcuna: era fortemente anemico e presentava parassiti di terzana lieve e semilune. Il sangue fu preso prima di cominciare l'intensa chinizzazione, che era richiesta dal caso.

La diagnosi fu sempre confermata microscopicamente appena i malati entravano nell'ospedale.

In tutti questi casi il fenomeno di Bordet e Gengou non si è mai verificato.

---

(1) Questi Annali, vol. XVII.

Ai colleghi, che mi hanno fornito il materiale di studio, esprimo qui i più vivi ringraziamenti. Mi astengo dall'aggiungere particolari anamnestici intorno ai malati, perchè, essendo il fenomeno negativo, non avrebbero alcun significato.

Queste mie ricerche non si possono confrontare con alcune esperienze dirette allo stesso scopo, che al Casagrandi riuscirono positive (1), perchè il metodo da lui scelto e seguito differisce alquanto da quello di *Bordet* e *Gengou*.

Riservandomi intanto di proseguire le cominciate ricerche, apportandovi ancora altre modificazioni, posso, dalle esperienze fatte, conchiudere che

Nella malaria umana il fenomeno di Bordet e Gengou non avviene neanche quando come antigene si adopera polvere di sangue pieno di parassiti malarici.

(1) Atti della Società per gli studi della malaria, vol. VIII, 1907.

ISTITUTO D'IGIENE SPERIMENTALE DELLA R. UNIVERSITÀ DI ROMA

La deviazione del complemento nelle tripanosomiasi sperimentali

per il dott. M. LEVI DELLA VIDA, assistente.

Prima di esporre le mie ricerche, credo non inutile ricordare brevemente in che cosa consista questo mezzo di indagine diagnostica, che in così breve tempo è stato oggetto di fortunate ricerche da parte di numerosi scienziati. Il metodo di Bordet-Gengou, modificato da Wassermann, è stato già applicato con pieno successo nell' infezione sifilitica; e lo stesso metodo ha trovato, per opera di Neisser e di Sachs e poi di altri sperimentatori, utile applicazione per la medicina legale. Ed io credo che, in seguito alle molte ricerche che con lo stesso metodo si vanno facendo in diverse direzioni, la deviazione del complemento potrà diventare un sussidio prezioso per l'estrema sua sensibilità, che potrà chiarire non pochi problemi della fisiologia, della patologia e della clinica.

La deviazione del complemento è strettamente legata alla dottrina dell'immunità. È noto come mescolando una emulsione di globuli rossi, per es. di bue, con una certa quantità del siero riscaldato di un coniglio trattato con ripetute iniezioni di emazie di bue, e aggiungendo una piccolissima quantità del siero fresco di una cavia normale, si osserva dopo un certo tempo la completa dissoluzione dei globuli rossi di bue. Tale reazione emolitica è dovuta al concorso di tre fattori: 1° i globuli rossi di bue; 2° un anticorpo specifico contenuto nel siero del coniglio immunizzato, l'ambocettore emolitico, capace di legarsi alle emazie e di *sensibilizzarle;* 3° finalmente il siero fresco di cavia normale, il complemento, dotato di affinità per il complesso ambocettore + globuli rossi, capace perciò di legarsi a tale complesso e di provocare la dissoluzione delle emazie. La reazione emolitica nel fenomeno di Bordet-Gengou serve di indicatore, ed ecco in qual modo. La maggior parte degli agenti infettivi e molte sostanze proteiche, artificialmente o naturalmente introdotte nell'organismo, determinano in questo, e

precisamente nel siero, eventualmente nel liquido cefalo-rachidiano, negli essudati e nei trasudati, ecc., la comparsa di anticorpi (1) specifici. Le sostanze, organizzate o no, capaci di determinare la produzione di anticorpi specifici, si chiamano *antigeni*. Gli antigeni e i loro anticorpi specifici hanno fra loro affinità, così come i globuli rossi per i rispettivi ambocettori emolitici; ed il complesso anticorpo + antigene, così come il complesso ambocettore + emazie, è fornito di affinità per il complemento. Cosicchè, se noi prepariamo opportunamente un miscuglio di un antigene e del rispettivo anticorpo, vi aggiungiamo il complemento, e dopo un certo tempo a questo complesso si aggiungono ancora delle emazie sensibilizzate (emazie + ambocettore emolitico), non si osserverà affatto emolisi, in quanto che il complemento non esiste più libero; esso è stato precedentemente assorbito, deviato dal complesso antigene + anticorpo. Si capisce perciò come la reazione di Bordet-Gengou possa servire, possedendo un antigene, alla ricerca dell'anticorpo: e viceversa, possedendo l'anticorpo, alla ricerca dell'antigene. Prendiamo per esempio quanto si è fatto per la sifilide. L'esperienza ha dimostrato che serve come antigene una emulsione del fegato di un eredo-sifilitico. Vogliamo ora accertare se un dato siero o un dato liquido cefalo-rachidiano appartenga ad un individuo sifilitico. Mescoliamo allora in varie proporzioni l'emulsione di fegato ed il siero o il liquido cerebro-spinale, e a tale miscela aggiungiamo un po' di siero fresco di cavia. Lasciamo le provette così allestite in termostato a + 37° per due ore e quindi aggiungiamo delle emazie di bue, sensibilizzate con siero di coniglio emolitico per il bue. Dopo un certo tempo osserviamo quanto è avvenuto: se non vi è emolisi, si potrà dire che il siero o il liquido cerebro-spinale da noi aggiunto all'antigene conteneva gli anticorpi specifici (il complesso antigene + anticorpo si è impodronito del complemento contenuto nel siero di cavia, e le emazie sensibilizzate aggiunte successivamente non hanno più trovato quel fattore che doveva indurre l'emolisi); se invece si osserva la reazione emolitica, si deve concludere che nel siero in esame non esistevano anticorpi, ed essendo mancato il legame antigene-anticorpo, capace di deviare il complemento, questo, rimasto libero, si è unito alle emazie sensibilizzate e le ha disciolte.

La deviazione del complemento quale è stata applicata in alcune ricerche di medicina legale è invece intesa alla diagnosi dell'antigene, possedendosi un anticorpo noto. Supponiamo di dover diagnosticare la provenienza di una macchia di sangue. Sciogliamo la macchia in poca soluzione fisiologica e mescoliamo in varie provette tale soluzione con piccole quantità di siero riscaldato prelevato da vari conigli immunizzati rispettivamente con siero, per es. di uomo, di bue, di pollo, ecc. Ad ogni provetta si aggiunge una piccola quantità di siero fresco di cavia (complemento), e dopo due ore di permanenza in termostato si versa in ogni provetta il complesso emolitico. Osservando quanto è avvenuto dopo un certo tempo si vedrà mancare l'emolisi soltanto in una serie di provette, per es. in quelle in cui vi era, in varia

(1) Adopererò sempre la parola *anticorpo* nel senso più lato, senza volerne affatto indicare la natura batteriolitica, citolitica, ecc. In questo stesso senso Citron ha usato la parola di *ambocettore*.

proporzione, il siero del coniglio immunizzato con siero di uomo (anticorpo): concluderemo quindi che la macchia di sangue della quale volevamo conoscere la provenienza era di sangue umano, rappresentando essa l'antigene del siero suddetto (1).

La reazione di Bordet-Gengou ha su tutte le altre il pregio di una sensibilità squisita, di molto (100, 1000 e più volte) superiore, a parità di condizioni, a quella della reazione precipitante.

Perchè la reazione della deviazione del complemento dia risultati attendibili è però necessario: 1° determinare esattamente la minima quantità di siero emolitico capace di sensibilizzare un cmc. della emulsione di globuli rossi; e determinare quale è la minima quantità di complemento capace di emolizzare completamante i globuli sensibilizzati: nel fare la reazione si useranno le quantità doppie di quelle determinate (per il complemento di cavia si adopera 0.1 cmc. essendo di solito 0.05 il titolo del siero di cavia); 2° allestire insieme con le prove dei sieri o dei liquidi da esaminare un gran numero di prove di controllo; e precisamente accertarsi: *a*) che nè l'anticorpo nè l'antigene per sè soli siano capaci di determinare la dissoluzione delle emazie sensibilizzate in assenza del complemento; *b*) che nè l'anticorpo nè l'antigene per sè soli possano distruggere l'azione dissolvente del complemento; *c*) che il sospettato anticorpo o il sospettato antigene non diano la deviazione del complemento quando siano uniti con sostanze della stessa natura rispettivamente dell'antigene o dell'anticorpo, ma provenienti da organismi normali; *d*) e finalmente che il siero emolitico e il complemento siano attivi, e che in assenza di questi due fattori le emazie si conservino perfettamente inalterate. Tutte queste prove di controllo rendono certamente molto più complicata la reazione, e possibile la sua applicazione soltanto in laboratori forniti dei mezzi di indagine necessari, e da parte di persone esercitate in questo genere di ricerche: però per la dimenticanza anche di un solo controllo è accaduto di venire a conclusioni che le ulteriori esperienze hanno completamente smentito.

La deviazione del complemento, oltre che nella sifilide e lesioni parasifilitiche, e nel ricercare la natura e la provenienza di sostanze proteiche a scopo forense o per studi fisiologici, è stata applicata con vario successo: per la dimostrazione di sostanze tubercolari e anti-

---

(1) Tale reazione è stata modificata, perchè sia di più facile applicazione pratica, da Neisser e Sachs. Gli AA. adoperano come complemento il siero di un animale naturalmente emolitico verso una data specie di emazie; ed in vece del complesso emolitico aggiungono soltanto, come indicatore, questa specie di globuli rossi.

tubercolari negli organismi tubercolosi; per la dimostrazione di anticorpi nei sieri antigonococcico e antimeningococcico; nei tumori maligni e nella leucemia; nella tosse convulsa; nella lepra; per gli streptococchi; nella rabbia e nel vaccino; nel tifo; nel mal rosso e nella peste dei suini, ecc.

Ma vi è una serie di infezioni nelle quali il fenomeno di Bordet-Gengou potrebbe rendere grandissimi servigi a scopo diagnostico: sono queste le malattie protozoarie dell'uomo e degli animali utili, malaria e tripanosomiasi (p. es. malattia del sonno). In queste infezioni il reperto parassitario nel sangue è per lunghi periodi negativo e durante questi periodi appunto spesso la diagnosi rimane oscura.

In uno studio da me fatto alcuni mesi or sono sul « trattamento preventivo e curativo delle infezioni protozoarie e in ispecie delle piroplasmosi » (1) da varie esperienze ero venuto alla conclusione che la via da seguire in queste infezioni dovesse essere del tutto diversa da quella seguìta per le infezioni di natura batterica, non essendovi in quelle alcun fatto paragonabile sicuramente a quanto si verifica nella guarigione e nella immunità delle malattie da schizomiceti.

Fra l'esperienze da me tentate vi era anche la deviazione del complemento in alcuni cani infetti con *Trypanosoma equinum*, agente di una malattia di cavalli; esperienze che avevano dato risultati completamente negativi.

Ho voluto ora ripetere la prova di Bordet-Gengou con tutti gli stipiti di tripanosomi conservati nell'Istituto d'Igiene, e variando sia gli animali da cui prelevavo il siero, sia la preparazione dell'antigene, sia finalmente i componenti il complesso emolitico. E tanto più mi interessava ripetere le mie esperienze, in quanto che altri autori hanno sostenuto potersi applicare il metodo della deviazione del complemento anche alle infezioni protozoarie: così il Casagrandi (2) per la malaria umana; e così Citron (3), pur non avendo pubblicato in proposito alcun lavoro speciale, riferisce che, da alcune ricerche fatte sui tripanosomi della Nagana, egli crede essere il metodo di Bordet-Gengou utilizzabile nelle malattie da protozoi; e infine Weber (4) dice di avere osservato la

---

(1) Questi Annali, 1907, p. 347.

(2) Casagrandi. *Diagnosi della malaria latente.* « Il Policlinico », sezione pratica, 1907, p. 718.

(3) Citron. *Ueber Komplementbindungsversuche bei infektiösen und postinfektiösen Erkrankungen*, ecc. Deut. med. Woch., 1907, p. 1171.

(4) Weber. *Ueber Immunisierungs-und Behandlungsversuche bei Trypanosomenkrankheiten.* Rif. in Bull. Inst. Pasteur, 1907. p. 782.

deviazione del complemento *qualchevolta* con gli organi di animali infetti con *Trypanosoma Brucei*.

Ho fatto varie prove di deviazione del complemento col siero di alcune cavie o di un coniglio infettati con il *Trypanosoma Brucei*; col siero di due cavie infette con il *Tryp. equinum*; col siero di due cavie infette con il *Tryp. gambiense*. Mi sono servito come antigene di sangue molto ricco in tripanosomi della stessa specie di quella con cui erano infetti gli animali dei quali saggiavo il siero; il sangue era trattato col metodo indicato da Marie e Levaditi (1) per la preparazione dell'antigene sifilitico, e cioè disseccato nel vuoto in presenza di acido solforico, quindi polverizzato; qualche ora prima di servirsene si scioglieva la polvere nelle proporzioni di 1:30. Il siero emolitico proveniva da conigli immunizzati con emazie lavate di bue o di pecora: titolo dei sieri da 1:600 a 1:2500.

Il siero è stato raccolto, dalle cavie infette di *Tryp. Brucei*, 2, 4, 5 settimane, 45 giorni dopo la inoculazione endoperitoneale del virus; dal coniglio la prima volta 3 settimane, la seconda 45 giorni dopo la infezione.

Le seguenti tabelle dimostrano in dettaglio tutta la disposizione delle esperienze ed il risultato di esse.

---

(1) MARIE e LEVADITI. *Les anticorps syphilitiques dans le liquide céphalorachidien des paralitiques généraux et des tabétiques*. Ann. Inst. Pasteur, 1907, p. 138.

TABELLA I.

Antigene (polvere di sangue con Tryp. Brucei sciolta in soluzione fisiologica 1:30)	Siero riscaldato cavia 4 (2 settimane dopo l'infezione)	Complemento	Na Cl 0.85 %	Complesso emolitico per il bue (1:600)	Risultato
0.20	0.10	0.1	0.60	1.0	Emolisi completa.
0.20	0.20	0.1	0.50	1.0	Id.
..	0.20	0.1	0.70	1.0	Id.
..	0.20	..	0.80	1.0	Nessuna emolisi.
0.20	..	0.1	0.70	1.0	Emolisi completa.
0.20	..	..	0.80	1.0	Nessuna emolisi.
..	..	0.1	0.90	1.0	Emolisi completa.
..	..	..	1.0	1.0	Nessuna emolisi.

2h a 37°

1h a 37°

Antigene (polvere di sangue con Tryp. Brucei sciolta in soluzione fisiologica 1:30	Siero riscaldato cavia 4 (2 settimane dopo l'infezione)	Complemento (1) (diluz. 1:2,5)	Na Cl 0.85 %	Complesso emolitico per la pecora (1:3000)	Risultato
0.20	0.10	0.1	0.60	1.0	Emolisi quasi completa.
0.20	0.20	0.1	0.50	1.0	Id.
..	0.20	0.1	0.70	1.0	Id.
..	0.20	..	0.80	1:0	Nessuna emolisi.
0.20	..	0.1	0.70	1.0	Emolisi quasi completa.
0.20	..	..	0.80	1.0	Nessuna emolisi.
..	..	0.1	0.90	1.0	Emolisi quasi completa.
..	..	..	1.0	1.0	Nessuna emolisi.

2h a 37°

1h a 37°

(1) Nelle esperienze in cui ho usato come complesso emolitico i globuli rossi di pecora ed il siero di coniglio preparato con questi globuli, ho adoperato sempre una quantità di complemento più piccola di quella adoperata quando usavo come complesso emolitico le emazie di bue + siero specifico, essendomi convinto che il siero di cavia è attivo, nel primo caso, in una dose alquanto minore.

TABELLA II.

Antigene (polvere di sangue con Tryp. Brucei sciolta in soluzione fisiologica 1:30)	Siero cavia 3 (4 settimane dopo l'infezione)	Complemento	Na Cl 0.85 %	Complesso emolitico per il bue (1:600)	Risultato

Disposizione delle esperienze e risultati come nella Tabella I.

TABELLA III.

Antigene (polvere di sangue con Tryp. Brucei ciolta in soluzione a fisiologica 1 : 30)	Siero riscaldato cavia 1 (5 settimane dopo l'infezione	Complemento	Na Cl 0.85 %	Complesso emolitico per il bue (1 : 600)	Risultato

Disposizione delle esperienze e risultati come nella Tabella I.

TABELLA IV.

Antigene (polvere di sangue con Tryp. Brucei sciolta in soluzione fisiologica 1 : 30)	Siero riscaldato coniglio 2 (1° salasso; 3 settimane dopo l'infezione)	Complemento	Na Cl 0.85 %	Complesso emolitico per il bue (1 : 600)	Risultato
0.20	0.10	0.10	0.60	1.0	Emolisi quasi completa.
0.20	0.20	0.10	0.50	1.0	Id.
..	0.20	0.10	0.70	1.0	Id.
..	0.20	..	0.80	1.0	Nessuna emolisi.
0.20	..	0.10	0.70	1.0	Emolisi quasi completa.
0.20	..	..	0.80	1.0	Nessuna emolisi.
..	..	0.10	0.90	1.0	Emolisi completa.
..	..	..	1.0	1.0	Nessuna emolisi.

2h a 37°

1h a 37°

(*Segue*) TABELLA IV.

Antigene (polvere di sangue con Tryp. Brucei sciolta in soluzione fisiologica 1 : 30)	Siero riscaldato coniglio 2 (1° salasso; 3 settimane dopo l'infezione)	Complemento (diluz. 1 : 2,5)	Na Cl 0.85 %	Complesso emolitico per la pecora (1 : 3000)	Risultato
0.20	0.10	0.10	0.60	1.0	Emolisi scarsa.
0.20	0.20	0.10	0.50	1.0	Id.
..	0.20	0.10	0.70	1.0	Id.
..	0.20	..	0.80	1.0	Emolisi quasi completa.
0.20	..	0.10	0.70	1.0	Id.
0.20	..	..	0.80	1.0	Nessuna emolisi.
..	..	0.10	0.90	1.0	Emolisi quasi completa.
..	..	..	1.0	1.0	Nessuna emolisi.

2h a 37°

1h a 37°

TABELLA V.

Antigene (polvere di sangue con Tryp. Brucei sciolta in soluzione fisiologica 1 : 30)	Siero riscaldato cavia 2 (45 giorni dopo l'infezione)	Complemento	Na Cl 0.85 %	Complesso emolitico per il bue (1 : 600)	Risultato

Disposizione delle esperienze e risultati come nella Tabella I.

TABELLA VI.

Antigene (polvere di sangue con Tryp. Brucei sciolta in soluzione fisiologica 1 : 30)	Siero riscaldato coniglio 2 (2° salasso; 45 giorni dopo l'infezione)	Complemento	Na Cl 0.85 %	Complesso emolitico per il bue (1 : 600)	Risultato
0.20	0.10	0.10	0.60	1.0	Tracce di emolisi.
0.20	0.20	0.10	0.50	1.0	Nessuna emolisi.
..	0.20	0.10	0.70	1.0	Id.
..	0.20	..	0.80	1.0	Id.
0.20	..	0.10	0.70	1.0	Emolisi completa.
0.20	..	..	0.80	1.0	Nessuna emolisi.
..	..	0.10	0.90	1.0	Emolisi completa.
..	..	..	1.0	1.0	Nessuna emolisi.

2h a 37°

1h a 37°

Antigene (polvere di sangue con Tryp. Brucei sciolta in soluzione fisiologica 1 : 30)	Siero riscaldato coniglio 2 (2° salasso; 45 giorni dopo l'infezione	Complemento (diluz. 1 : 2)	Na Cl 0.85 %	Complesso emolitico per la pecora (1 : 3000)	Risultato
0.20	0.10	0.10	0.60	1.0	Tracce di emolisi.
0.20	0.20	0.10	0.50	1.0	Nessuna emolisi.
..	0.20	0.10	0.70	1.0	Id.
..	0.20	..	0.80	1.0	Id.
0.20	..	0.10	0.70	1.0	Emolisi completa.
0.20	..	..	0.80	1.0	Nessuna emolisi.
..	..	0.10	0.90	1.0	Emolisi completa.
..	..	..	1.0	1.0	Nessuna emolisi.

2h a 37°

1h a 37°

Il risultato di tutte le esperienze fatte con il siero di cavia dimostra che in nessuno degli animali infettati col *Tryp. Brucei*, durante il decorso della malattia fra il 15° ed il 45° giorno, esistono nel siero

anticorpi capaci di dare il fenomeno della deviazione del complemento. Le esperienze fatte col siero di coniglio (tab. IV e VI) hanno fatto rilevare un fenomeno che avrebbe potuto far credere all'esistenza della deviazione specifica del complemento, ove esso non fosse avvenuto anche in una delle prove di controllo. Il fenomeno, appena accennato nella tab. IV, è evidentissimo nella tab. VI: qui infatti nella prima provetta si osservano soltanto tracce di emolisi e questa manca assolutamente nella seconda provetta; ma che questo non sia dovuto al fenomeno di Bordet-Gengou, che non vi sia nulla di specifico, lo dimostra il fatto che nella terza provetta in cui non vi è l'antigene, l'emolisi è pure mancata. L'azione inibitrice dell'emolisi è proporzionale alla quantità di siero: ma dalle esperienze sin qui fatte non posso ancora concludere se essa sia dovuta ad una azione protettiva del siero sulle emazie, ad una vera sostanza emosozica, oppure all'assorbimento o alla neutralizzazione del complemento da parte del siero.

I risultati delle prove fatte col siero di cavia infetta con *Tryp. equinum* sono indicati dalle tabelle seguenti. La cavia n. 21 è stata salassata due mesi dopo essere stata infettata per via endoperitoneale, la cavia n. 22 un mese dopo il giorno dell'infezione.

TABELLA VII.

Antigene (polvere di sangue con Tryp. equinum in soluzione fisiologica 1:30)	Siero riscaldato cavia 22 (1 mese dopo l'infezione)	Complemento	Na Cl 0.85 %	Complesso emolitico per il bue (1:600)	Risultato
0.20	0.10	0.10	0.60	1.0	Emolisi completa.
0.20	0.20	0.10	0.50	1.0	Id.
..	0.20	0.10	0.70	1.0	Id.
..	0.20	..	0.80	1.0	Nessuna emolisi.
0.20	..	0.10	0.70	1.0	Emolisi completa.
0.20	..	..	0.80	1.0	Nessuna emolisi.
..	..	0.10	0.90	1.0	Emolisi completa.
..	..	..	1.0	1.0	Nessuna emolisi.

2h a 37°

1h a 37°

Antigene (polvere di sangue con Tryp. equinum in soluzione fisiologica 1:30)	Siero riscaldato cavia 22 (1 mese dopo l'infezione)	Complemento (diluz. 1:2)	Na Cl 0.85 %	Complesso emolitico per la pecora (1:3000)	Risultato
0.20	0.10	0.10	0.60	1.0	Emolisi completa.
0.20	0.20	0.10	0.50	1.0	Id.
..	0.20	0.10	0.70	1.0	Id.
..	0.20	..	0.80	1.0	Nessuna emolisi.
0.20	..	0.10	0.70	1.0	Emolisi completa.
0.20	..	..	0.80	1.0	Nessuna emolisi.
..	..	0.10	0.90	1.0	Emolisi completa.
..	..	..	1.0	1.0	Nessuna emolisi.

2h a 37°

1h a 37°

TABELLA VIII.

Antigene (polvere di sangue con Tryp. equinum in soluzione fisiologica 1 : 30)	Siero riscaldato cavia 21 (2 mesi dopo l'infezione)	Complemento	Na Cl 0.85 %	Complesso emolitico per il bue (1 : 600)	Risultato
0.20	0.10	0.10	0.60	1.0	Nessuna emolisi.
0.20	0.20	0.10	0.50	1.0	Id.
..	0.20	0.10	0.70	1.0	Id.
..	0.20	..	0.80	1.0	Id.
0.20	..	0.10	0.70	1.0	Emolisi completa.
0.20	..	..	0.80	1.0	Nessuna emolisi.
..	..	0.10	0.90	1.0	Emolisi completa.
..	..	..	1.0	1.0	Nessuna emolisi.

2h a 37°

1h a 37°

Antigene (polvere di sangue con Tryp. equinum in soluzione fisiologica 1 : 30)	Siero riscaldato cavia 21 (2 mesi dopo l'infezione)	Complemento (dilus. 1 : 2)	Na Cl 0.85 %	Complesso emolitico per la pecora (1 : 3000)	Risultato
0.20	0.10	0.10	0.60	1.0	Nessuna emolisi.
0.20	0.20	0.10	0.50	1.0	Id.
..	0.20	0.10	0.70	1.0	Id.
..	0.20	..	0.80	1.0	Id.
0.20	..	0.10	0.70	1.0	Emolisi completa.
0.20	..	..	0.80	1.0	Nessuna emolisi.
..	..	0.10	0.90	1.0	Emolisi completa.
..	..	..	1.0	1.0	Nessuna emolisi.

2h a 37°

1h a 37°

I risultati della tabella VII collimano perfettamente con quanto si è osservato nelle cavie infette di *Tryp. Brucei.*

Nelle prove invece indicate dalla tabella VIII si è osservato lo stesso fenomeno di cui ho parlato a proposito delle prove fatte col siero del coniglio 2.

Le esperienze sul *Tryp. gambiense* riguardano due cavie infette da lunghissimo tempo; e ciò è possibile con questa specie di tripanosoma che lascia in vita gli animali per molti mesi. Le prove sono riferite nelle tabelle IX e X: nella prima sono le prove fatte col siero di una cavia infettata da tre mesi e mezzo; la cavia il cui siero ha servito per le prove descritte nella seconda tabella era stata inoculata da oltre quattro mesi.

TABELLA IX.

Antigene (polvere di sangue con Tryp. gambiense in soluzione fisiologica 1 : 30)	Siero riscaldato cavia 97 (3 mesi e ½ dopo l'infezione)	Complemento	Na Cl 0.85 %	Complesso emolitico per il bue (1 : 600)	Risultato
0.20	0.10	0.10	0.60	1.0	Nessuna emolisi.
0.20	0.20	0.10	0.50	1.0	Id.
..	0.20	0.10	0.70	1.0	Id.
..	0.20	..	0.80	1.0	Id.
0.20	..	0.10	0.70	1.0	Emolisi completa.
0.20	..	..	0.80	1.0	Nessuna emolisi.
..	..	0.10	0.90	1.0	Emolisi completa.
..	..	..	1.0	1.0	Nessuna emolisi.

2h a 37°

1h a 37°

Antigene (polvere di sangue con Tryp. gambiense in soluzione fisiologica 1 : 30)	Siero riscaldato cavia 97 (3 mesi e ½ dopo l'infezione)	Complemento (diluz. 1:2)	Na Cl 0.85 %	Complesso emolitico per la pecora (1 : 3000)	Risultato
0.20	0.10	0.10	0.60	1.0	Nessuna emolisi.
0.20	0.20	0.10	0.50	1.0	Id.
..	0.20	0.10	0.70	1.0	Id.
..	0.20	..	0.80	1.0	Id.
0.20	..	0.10	0.70	1.0	Emolisi quasi completa.
0.20	..	..	0.80	1.0	Nessuna emolisi.
..	..	0.10	0.90	1.0	Emolisi completa.
..	..	..	1.0	1.0	Nessuna emolisi.

2h a 37°

1h a 37°

TABELLA X.

Antigene (polvere di sangue con Tryp. gambiense in soluzione fisiologica 1 : 30)	Siero riscaldato cavia 106 (4 mesi e ½ dopo l'infezione)	Complemento	Na Cl 0.85 %	Complesso emolitico per il bue (1 : 600)	Risultato
0.20	0.10	0.10	0.60	1.0	Emolisi quasi completa.
0.20	0.20	0.10	0.50	1.0	Id.
..	0.20	0.10	0.70	1.0	Id.
..	0.20	..	0.80	1.0	Nessuna emolisi.
0.20	..	0.10	0.70	1.0	Emolisi quasi completa.
0.20	..	..	0.80	1.0	Nessuna emolisi.
..	..	0.10	0.90	1.0	Emolisi completa.
..	..	..	1.0	1.0	Nessuna emolisi.

2h a 37°

1h a 37°

Il siero della cavia 106 non possiede dunque anticorpi capaci di dare il fenomono della deviazione specifica del complemento; il siero della cavia 97 poi ha dato luogo allo stesso fenomeno osservato a proposito del coniglio 2 e della cavia 21, che dimostra una proprietà del siero di inibire la emolisi che l'azione del complemento dovrebbe indurre sulle emazie sensibilizzate.

Ho già accennato che ancora non mi sento autorizzato a dare una spiegazione del meccanismo di questo fenomeno, nè ho dati per affermare che esso sia identico all'azione protettiva osservata dal De Blasi (1) nel siero umano o al fenomeno studiato da Ranzi (2); e non posso neppure dire se l'azione inibitrice dell'emolisi possa essere in qualche rapporto con la infezione degli animali dai quali proveniva il siero: le mie osservazioni però mi fanno ritenere improbabile tale fatto, e

(1) DE BLASI. *Intorno alla presenza di emolisine nella malaria umana.* Atti della Società per gli studi della malaria, 1906, p. 125; e questi Annali, 1907, pag. 677 (*Sulla deviazione del complemento nella malaria umana*).

(2) RANZI. *Ueber Komplementablenkung durch Serum und Organe.* Wien. klin. Woch., 1906, p. 1552.

per lo meno mi autorizzano a negare che esso sia in alcun rapporto con la più o meno lunga durata dell'infezione. Infatti delle due cavie infette col *Tryp. equinum* è stato il siero di quella malata da più lungo tempo che ha mostrato di possedere una proprietà inibitrice dell'emolisi; mentre nelle esperienze col siero delle cavie infette col *Tryp. gambiense*, l'emolisi è mancata là dove era stato aggiunto il siero della cavia inoculata da minor tempo.

Come conclusione generale delle mie ricerche, credo potere affermare che *il siero degli animali infetti con Tryp. Brucei, Trip. equinum e Tryp. gambiense, non contiene anticorpi capaci di determinare il fenomeno di Bordet-Gengou*; e ciò mi conferma sempre più nella opinione da me espressa altra volta *che cioè nelle infezioni da protozoi in genere non si determini la produzione di anticorpi specifici, paragonabili a quelli che si possono mettere in evidenza nelle infezioni di origine batterica.*





